



**GENOTIPAGEM DO VÍRUS CITOMEGÁLICO HUMANO NA
INFEÇÃO CONGÊNITA**

FÁBIO ANDRÉ DIAS FERREIRA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO 2016



Genotipagem do vírus citomegálico humano na infeção congénita

Fábio André Dias Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Médica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Paixão

Co-orientadora: Mestre Maria de Jesus Chasqueira

Unidade de Infecção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa

Janeiro 2016

Apresentação científica efetuada no âmbito deste trabalho

Poster:

Fábio Ferreira, Lúcia Rodrigues, Maria de Jesus Chasqueira, Paulo Paixão. Outubro 2015. Utilização da PCR em tempo real para genotipagem de CMV na infeção congénita. 14º Encontro Nacional de Atualização em Infeciologia. Porto, Portugal (Anexo 1).

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Paixão pela oportunidade que me deu, ao permitir que pudesse realizar a dissertação de mestrado na área, para mim, das mais fascinantes em Microbiologia. Pela sua orientação, transmissão de conhecimentos e incentivo ao longo deste percurso.

À Mestre Maria de Jesus Chasqueira pela coorientação dada durante a execução deste trabalho, paciência e rigor demonstrados, principalmente na árdua tarefa de escrita. Os seus incentivos e esclarecimentos revelaram-se, por vezes, decisivos.

Ao grupo da Unidade de Infecção da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas pelo auxílio prestado em momentos de apuro ou dúvida e pelos momentos de boa disposição, nomeadamente à técnica Lúcia Rodrigues.

À minha família, nomeadamente aos meus pais, avós e tias pelo apoio incondicional, compreensão e por todos os ensinamentos que me transmitiram, não só nesta fase, mas em toda a minha vida académica. Nada disto teria resultado sem ter por detrás estes meus super-heróis.

Às grandes companheiras de tese: As minhas Cajozinhas (Joana e Cate), *Ice* e Tita pelo espírito de entreajuda, camaradagem e compreensão. Só vocês imaginam a luta por que passámos. Mas que fique aqui registado que ultrapassámos e da melhor forma: a sorrir, a gargalhar... Estamos juntos malta!

Finalmente a todos os meus amigos, que tornaram os momentos menos bons suportáveis, com todo o apoio que lhes era possível. Em especial à Patrícia Chaves, pela grande amizade, suporte, paciência e sobretudo pelo papel de psicóloga, mesmo do outro lado do mundo, provando que as distâncias não passam disso mesmo, distâncias físicas.

Resumo

O CMV é o principal agente de infecção congênita, atingindo cerca de 0,2 a 2,2% de todos os recém-nascidos. Este agente exibe uma imensa variabilidade genética principalmente nos genes que codificam glicoproteínas estruturais do invólucro. A mais relevante é a glicoproteína B (gB) do vírus, codificada pelo gene UL55, sendo um importante alvo do sistema imunitário do hospedeiro humano. Com base nas variações de seqüências deste gene, o vírus pode ser classificado em pelo menos, 4 genótipos distintos (gB1-4).

O objetivo do presente estudo foi determinar quais os genótipos para o UL55, presentes em amostras de casos de infecção congênita e/ou perinatal utilizando a técnica de PCR em tempo real. A confirmação dos resultados foi realizada por técnicas de sequenciação (Sanger e *Next-Generation Sequencing*) e por análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). No total, foram analisadas 36 amostras de urina e 20 amostras de líquido amniótico (LA), colhidos entre 2009 e 2016.

Das 35 amostras de urina genotipadas, em 29 foi detetado um genótipo (13 gB1; 7 gB2; 6 gB4; 3 gB3), sendo em 6 detetado mais do que um genótipo. Das 19 amostras de LA, em 17 foi detetado um genótipo (5 gB1; 5 gB2; 5 gB3; 2 gB4) e em 2 foi detetado mais do que um genótipo. Não houve amplificação em 2 amostras (1 urina e 1 LA). Recorrendo às diferentes técnicas de confirmação, não foi possível confirmar a presença de infecções mistas nem de 5 gB4 detetados em amostras de urina.

A nível nacional, o gB1 parece ser o genótipo mais frequente na infecção congênita, em concordância com o descrito na literatura. Corroborámos também a ideia de que todos os genótipos estão envolvidos neste tipo de infecção.

Por PCR em tempo real foi possível assinalar a existência de infecções mistas, no entanto, estes dados devem ser alvo de melhor análise, dadas as contradições, principalmente em comparação com a sequenciação.

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) is the main congenital infection agent, affecting about 0.2 to 2.2% of all newborns. This pathogen exhibits extensive genetic variability mainly in structural genes encoding envelope glycoproteins. The most relevant is the CMV glycoprotein B (gB), encoded by the UL55 gene, is an important target of the immune system of the human host. On the basis of sequence variation of this gene, the virus can be classified, at least into 4 gB genotypes (types 1-4).

The aim of this study was to determine the genotypes for UL55, present in samples from cases of congenital and/or perinatal infection using real-time PCR. Confirmation of the results was performed by sequencing techniques (Sanger and Next-Generation Sequencing) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Overall, we analyzed 36 urines and 20 amniotic fluids (LAs), collected from 2009 to 2016.

Thirty-five urine samples could be assigned a gB genotype, in 29 was detected single genotype (13 gB1; 7 gB2; 6 gB4; 3 gB3). The presence of mixed genotypes was also detected in 6 urines. Of the 19 LAs, 17 has detected a single genotype (5 gB1; gB2 5, 5 gB3; two gB4). In 2 was detected mixed genotypes. No amplification was detected in other 2 samples (1 urine and 1 LA). Resorting to different techniques of confirmation was not possible to confirm the presence of mixed infections, neither 5 gB4 detected in urine samples.

At the national level, the gB1 seems to be the most common genotype in congenital infection, consistent with that described in the literature. Also we corroborate the notion that all genotypes can be involved in this type of infection.

For real-time PCR was also possible to note the existence of mixed infections, however, these data should be subjected to further analysis, given the apparent contradiction, in comparison to sequencing techniques.

Índice

Apresentação científica efectuada no âmbito deste trabalho.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix

1. Introdução

1.1 Enquadramento histórico.....	1
1.2 Vírus citomegálico humano.....	3
1.2.1 Taxonomia e morfologia do virião.....	3
1.2.2 Genoma do vírus.....	5
1.2.3 Ciclo replicativo viral: infeção lítica e latente.....	6
1.2.4 Diversidade do vírus em hospedeiros humanos.....	8
1.2.5 Epidemiologia: No Mundo e em Portugal.....	10
1.3 Clínica associada à infeção citomegálica.....	12
1.4 Diagnóstico laboratorial.....	13
1.4.1 Isolamento do vírus.....	13
1.4.2 Serologia.....	14
1.4.3 Antigenémia.....	14
1.4.4 Métodos de Biologia Molecular.....	15
1.4.5 Imuno-histoquímica.....	16
1.5 Genotipagem.....	17
1.5.1 Baseada em técnicas de PCR.....	20
1.5.2 Baseada na Sequenciação.....	21
1.6 Objetivos do trabalho experimental.....	25

2. Material e Métodos

2.1 População em estudo.....	26
2.2 Processamento das amostras.....	27
2.2.1 Extração de DNA.....	27

2.2.2 PCR em tempo real.....	28
2.2.2.1 Quantificação da carga viral total.....	28
2.2.2.2 Genotipagem.....	29
2.2.2.3 Critérios de validação dos resultados de PCR em tempo real.....	31
2.2.3 Confirmação dos resultados de PCR em tempo real.....	31
2.2.3.1 Sequenciação (Método de Sanger).....	31
2.2.3.2 Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP)...	33
2.2.3.3 <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS).....	33
3. Resultados	
3.1 PCR em tempo real.....	35
3.1.1 Genotipagem.....	35
3.1.2 Quantificação da carga viral total.....	40
3.2 Confirmação dos resultados por PCR em tempo real.....	41
3.2.1 Sequenciação (Método de Sanger).....	41
3.2.2 Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP).....	42
3.2.3 <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS).....	43
4. Discussão e conclusões	46
5. Referências bibliográficas	52
6. Anexos	77

Índice de Figuras

1. Introdução

Figura 1 – Células com inclusões intranucleares rodeadas por um halo claro observadas por Jesionek e Kiolemenoglou.....	1
Figura 2 – Thomas H. Weller, pediatra, parasitologista e virologista que descobriu o CMV.....	2
Figura 3 – Representação esquemática de uma partícula viral madura de CMV.....	4
Figura 4 – Expressão dos genes virais e respectivas funções dos produtos resultantes desses genes durante uma infecção produtiva por CMV.....	7
Figura 5 – Taxas de seroprevalência para CMV em mulheres em idade fértil e prevalência de infecção congênita ao nascimento.....	11
Figura 6 – Efeito citopático provocado por CMV em fibroblastos.....	13
Figura 7 – Resultado do perfil de bandas obtido por PCR-RFLP.....	19
Figura 8 – Esquema representativo da fase de amplificação da NGS.....	23
Figura 9 – Esquema representativo da fase de sequenciação na tecnologia de <i>Ion Torrent</i>	24

2. Material e métodos

Figura 1 – Distribuição por tipo de infecção nas amostras de urina analisadas (n=36) e respectiva distribuição do grau de severidade nas infecções congénitas (n=30).....	26
Figura 2 – Sequenciador PGM TM	34

3. Resultados

Figura 1 – Distribuição genotípica nas amostras de urina (n=35).....	37
Figura 2 – Distribuição genotípica nas amostras de LA (n=9).....	40
Figura 3 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Amostras U317, U323 e U49).....	41
Figura 4 – Representação do ponto de clivagem da enzima <i>RsaI</i> , no fragmento de 532pb amplificado a partir de uma amostra gB4.....	43
Figura 5 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (n=8).....	43
Figura 6 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Amostra U327).....	44
Figura 7 – Alinhamento múltiplo dos 4 tipos de gB.....	45

Índice de Tabelas

1. Introdução

Tabela 1 – Taxonomia do CMV.....	3
---	---

2. Material e métodos

Tabela 1 – <i>Follow up</i> dos recém-nascidos incluídos no estudo (n=9). A periodicidade de recolha das amostras não segue um padrão definido, variando entre os 2 dias e 18 meses.....	27
---	----

Tabela 2 – Sequência dos <i>primers</i> e sonda utilizados para amplificação e deteção do gene UL83.....	29
---	----

Tabela 3 – Sequência dos <i>primers</i> e sondas utilizados para amplificação e deteção dos diferentes genótipos da gB	30
---	----

Tabela 4 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de um fragmento (532pb) do gene UL55.....	31
--	----

3. Resultados

Tabela 1 – Valores de sensibilidade obtidos pela técnica de genotipagem por PCRtr, para os genótipos gB1, gB2, gB3 e gB4.....	36
--	----

Tabela 2 – Distribuição genotípica nas amostras de urina associada ao tipo de infeção a CMV (n=36).....	38
--	----

Tabela 3 – Distribuição genotípica em amostras de urina provenientes de recém-nascidos com infeção congénita assintomática (n=8) e sintomática (n=3).....	38
--	----

Tabela 4 – Distribuição genotípica nas amostras de urina de <i>follow up</i> (n=9).....	39
--	----

Tabela 5 – Carga viral total das amostras de <i>follow up</i> (n=9).....	41
---	----

Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos por PCR em tempo real e por sequenciação (n=13).....	42
--	----

Tabela 7 – Comparação dos resultados obtidos por PCR em tempo real e por NGS (n=7).....	45
--	----

Lista de Abreviaturas

°C	Grau Celsius
BLAST	Ferramenta bioinformática, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
CMV	Vírus citomegálico humano, do inglês <i>human cytomegalovirus</i>
Ct	Do inglês <i>Threshold cycle</i>
ddNTPs	Didesoxinucleótidos 5'-trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
gB, gN, gO, gH, gM e gL	Glicoproteínas do invólucro do vírus citomegálico humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
HMA	Ensaio de mobilidade de heteroduplexes, do inglês <i>heteroduplex mobility assay</i>
IgM, IgG	(IgM) Imunoglobulina M, (IgG) Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
kpb	Quilo par de bases
Mb	Mega par de bases
mg	Miligrama
MGB	Do inglês <i>Minor Groove Binder</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NASBA	Amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos, do inglês <i>nucleic acid sequence based amplification</i> .
nm	Nanómetro
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>polymerase</i>

	<i>chain reaction</i>
PGM	Sequenciador <i>IonTorrent Personal Genome Machine</i>
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
Tris-HCl	Tris-hidrocloreto
U	Unidade de atividade enzimática
UNG	Uracil-n-glicosilase, do inglês <i>uracil-n-glycosylase</i>
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

1. Introdução

1.1 Enquadramento histórico

As primeiras descrições de células com inclusões intranucleares típicas de infecção pelo vírus citomegálico humano (CMV) aparecem referenciadas nos trabalhos de Ribbert, em 1881, quando este visualizou células de grandes dimensões em rins de nados mortos e na glândula parótida de crianças. Só mais tarde interpretou a sua observação ao constatar que outros dois investigadores, Jesionek e Kiolomenoglu tinham documentado as mesmas observações em pulmões, rins e num fígado de um feto morto com 8 meses, descrevendo-as como uma espécie de células de protozoários contendo um “corpo nuclear central” rodeado por um halo claro [1] (Figura 1).

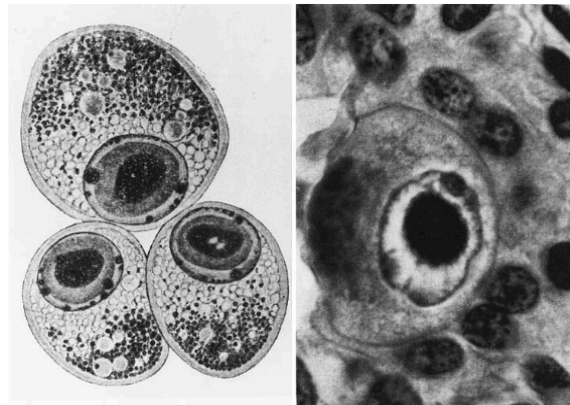


Figura 1 - Células com inclusões intranucleares rodeadas por um halo claro observadas por Jesionek e Kiolomenoglou [1].

Em 1932, Farber e Wolbach encontraram essas mesmas inclusões em células de glândulas salivares em 26 crianças, num total de 183 examinadas, chegando à conclusão que a infecção produzida pelo vírus desconhecido era altamente frequente [2].

Partindo destas observações Wyatt e colaboradores, em 1950, sugeriram a designação de “*generalized cytomegalic inclusion disease*” (CID) para caracterizar clinicamente esta doença “misteriosa”. Recomendaram que o diagnóstico fosse feito através da pesquisa, em sedimentos de urina, de células com inclusões, embora a etiologia vírica fosse ainda desconhecida [3].

Na mesma década, três investigadores e as suas equipas, conseguiram isolar de forma independente o agente da CID [4, 5]. Weller aplicou nos seus trabalhos as técnicas de cultura de células recém-descobertas na perspetiva de isolar *Toxoplasma gondii*, o que

permitiu o isolamento do vírus, sendo 3 anos mais tarde batizado pelo mesmo investigador como citomegalovírus [6, 7] (Figura 2).

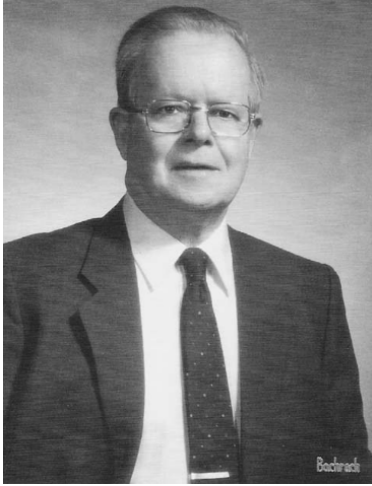


Figura 2 – Thomas H. Weller, pediatra, parasitologista e virologista que descobriu o CMV [1].

Nos anos subsequentes, foram inúmeras as contribuições que possibilitaram avanços importantes nesta área, a título de exemplo: Alguns autores demonstraram que a seroprevalência para CMV era elevada e que a mesma aumentava com a idade [1]. No campo da transmissão, alguns trabalhos pioneiros revelaram a importância das principais vias de transmissão: perinatal [8, 9, 10], sexual [11, 12], transplantação [13] e transfusão [14]. No campo da clínica, ressalva-se o estudo de Klemola que descreveu pela primeira vez um quadro semelhante à mononucleose infecciosa tendo como agente, o CMV [15].

Na infecção congénita, realça-se o papel de uma equipa do estado do Alabama (EUA), nomeadamente na área da transmissão [10, 16], na importância da infecção primária *versus* infecção recorrente [17, 18, 19], ou no diagnóstico [20, 21]. Destacaram-se nas áreas da patogénese [22], diagnóstico pré-natal [23] e pós-natal tardio [24], algumas equipas italianas.

Em 1996, Cha e colaboradores detetaram a perda de grandes segmentos do genoma da estirpe Towne, como resultado de passagens sucessivas em culturas celulares [25].

Já no século XXI, Boppana e colaboradores fizeram estudos acerca da imunidade pré-concepcional contra CMV em mães cujos filhos sofriam de infecção congénita chegando à conclusão que 10 das 16 mães cujos filhos estavam infetados adquiriram novos anticorpos específicos contra a glicoproteína H (gH) do vírus [1, 26].

1.2 Vírus citomegálico humano

1.2.1 Taxonomia e morfologia do virião

O CMV é o vírus de DNA mais complexo da família *Herpesviridae*. A estrutura do virião, a cinética da expressão génica viral e a capacidade de persistência ao longo da vida do hospedeiro, são características partilhadas com outros herpesvírus. Contudo, a especificidade estrita das espécies, tropismo pela glândula salivar e replicação lenta em cultura diferencia-o como protótipo da subfamília *Betaherpesvirinae* [27] (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxonomia do CMV [Adaptado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/180.html]

Taxonomia do CMV	
Ordem	<i>Herpesvirales</i>
Família	<i>Herpesviridae</i>
Subfamília	<i>Betaherpesvirinae</i>
Género	<i>Cytomegalovirus</i>
Espécie	Herpesvírus humano tipo 5
Classificação	Vírus dsDNA (Grupo I)
Baltimore	

Considerando a sua morfologia, o DNA do vírus encontra-se envolvido por uma cápside icosaédrica composta por 162 capsómeros. A cápside é circundada por um fino tegumento amorfo que, por sua vez encontra-se rodeado por um invólucro lipídico, constituindo assim um virião completo e maduro com cerca de 200nm de diâmetro [28] (Figura 3).

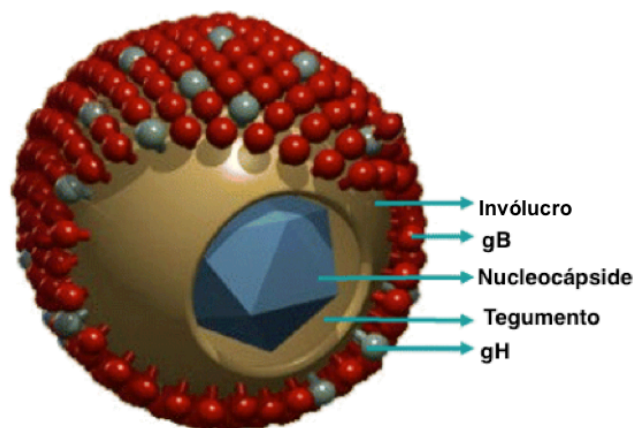


Figura 3 – Representação esquemática de uma partícula viral madura de CMV [Adaptado de <http://cmr.asm.org/content/22/1/76/F2.expansion.html>]

A maioria dos genes que codifica para as mais de 30 proteínas virais encontradas num virião infeccioso estão localizados na região *unique long* (UL). O genoma do vírus possui ainda um arranjo *unique short* (US) e regiões repetidas. Das mais de 30 proteínas virais, 4 constituem a cápside: a pUL46, a pUL48.5, e as proteínas *major* e *minor* da cápside (codificadas respectivamente, pelos genes UL85 e UL86) [29].

O invólucro fosfolipídico contém cerca de 6 tipos de glicoproteínas diferentes como a gB, gN, gO, gH, gM e gL codificadas respectivamente pelos genes UL55, UL73, UL74, UL75, UL100 e UL115. Estas glicoproteínas possuem um papel essencial na entrada do virião nas células hospedeiras, na sua maturação e na transmissão célula-a-célula [30].

Pela análise de mutações percebe-se que a interrupção das ORFs (*open reading frames*) nos genes que codificam para a gB, gH, gL e gM resulta na produção de progenia incapaz de infectar, o que sublinha o papel destas glicoproteínas para uma replicação produtiva. Apenas a gO parece ser dispensável para a replicação viral [31]. Os produtos proteicos resultantes dos genes que codificam para as 6 glicoproteínas *major* associam-se para formar 3 complexos que são altamente conservados dentro dos herpesvírus designando-se como gCI, gCII e gCIII [32].

Pelo menos 2 destes complexos são necessários para a entrada dos vírus nas células: o gCI composto por moléculas gB homodiméricas e o gCIII, heterodimérico, composto por uma gH, gL e gO [33].

A gB é uma glicoproteína que desempenha um papel crucial na ligação do vírus às células hospedeiras, uma vez que é a principal estrutura de superfície do invólucro viral.

Participa também na entrada do vírus nas células, na disseminação célula-a-célula, e na fusão celular. Em virtude da sua abundância e capacidade para induzir anticorpos neutralizantes, tem sido estudada a hipótese de esta molécula ser utilizada numa possível vacina recombinante [34]. Por sua vez, o gCIII é necessário para a fase final de entrada do vírus através da fusão do invólucro viral com a membrana da célula [35]. O complexo gCII resulta de uma associação entre a gM e a gN [36].

Devido à interação com o sistema imunitário do hospedeiro, os genes que codificam para a gB, gH, e gN são considerados altamente polimórficos podendo ser agrupados em diferentes genótipos segundo técnicas de genotipagem abordadas mais à frente [29].

As restantes 20-25 proteínas estruturais do virião provavelmente estão localizadas na camada amorfa existente entre a nucleocápside e o invólucro, estando estas ainda pouco caracterizadas [37]. As proteínas do tegumento podem estar envolvidas na maturação dos viriões da progenia ou podem influenciar eventos virais e celulares nas fases iniciais do processo de infeção, tais como a libertação de DNA viral a partir de partículas virais ou a regulação de promotores virais e celulares. A maioria destas proteínas são fosforiladas e altamente imunogénicas. As mais abundantes são as proteínas ppUL32 (pp150 ou fosfoproteína básica), a ppUL83 e a pp65, sendo a última mais conhecida por ser o antígeno alvo utilizado nos ensaios de antigenémia para o diagnóstico rápido de infeções clínicas por CMV [29, 38].

1.2.2 Genoma do vírus

O genoma do CMV é composto por uma cadeia dupla de DNA (dsDNA) de aproximadamente 240kpb tendo já sido demonstrada, por sequenciação, a existência de ORFs codificando para mais de 200 proteínas potencialmente imunogénicas. Este é o maior genoma de todos os herpesvírus contendo um elevado teor de G+C [39].

A comparação das sequências de aminoácidos da estirpe AD169 com outros genomas de herpesvírus revela que as proteínas resultantes de mais de 40 ORFs partilham elevada similaridade com as proteínas codificadas pelos alfa e gammaherpesvírus fornecendo mais evidências de que existiu uma origem comum às três subfamílias [40, 41]. Das ORFs conservadas entre os herpesvírus, cerca de 25% parecem codificar para funções relacionadas com o metabolismo do DNA viral e com a replicação, enquanto

que os restantes 75% codificam para funções envolvidas na organização estrutural e maturação dos viriões [29].

Através de estudos bioquímicos, genéticos e de pesquisa de homologia de sequências, das 200 ORFs identificadas no genoma de CMV [42], apenas se conhece a função de algumas delas. No entanto, pela análise dos fenótipos de mutantes resultantes de deleções espontâneas ou de inativações de *loci* específicos, ficou demonstrado que mais de 50 ORFs do genoma deste vírus são dispensáveis para uma replicação produtiva em culturas de fibroblastos. Estes resultados, juntamente com as observações de que existem proteínas responsáveis por funções comuns a todos os herpesvírus, tais como replicação do DNA, organização e maturação do virião indicam que muitas ORFs ainda aguardam uma caracterização funcional [43].

1.2.3 Ciclo replicativo viral: Infecção lítica e latente

Uma característica deste vírus é o seu amplo tropismo celular, possuindo a capacidade de infectar quase todos os tipos de tecidos e de órgãos no hospedeiro humano. Estudos *in vitro* demonstram a capacidade de entrada deste vírus numa ampla variedade de células, incluindo dendríticas, endoteliais, epiteliais, fibroblastos e monócitos/macrófagos [10, 44, 45]. No entanto, como a infecção nesses tipos de células permissivas se traduz em patologia específica está longe de ser conhecida.

Sabe-se que a entrada do CMV se inicia com uma fase de ligação do virião aos proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) da membrana celular num processo mediado pelas gB e gM [46, 47, 48]. Recorrendo a estudos realizados *in vitro*, demonstra-se que a ligação aos HSPGs é um passo essencial no processo de entrada do vírus auxiliando-o na sua estabilização à superfície celular.

A interação das glicoproteínas com os recetores celulares (ainda por identificar) é suficiente para desencadear uma via de transdução de sinal intracelular, que conduz a uma alteração da expressão dos genes da célula hospedeira. A maioria das mudanças nos perfis de atividade desses genes assemelham-se às alterações induzidas pela ligação de interferões aos recetores da célula [49, 50, 51].

Após a fusão das membranas segue-se a entrada da nucleocápside e das proteínas do tegumento no citoplasma, sendo a sua translocação para o núcleo muito rápida. A pp65 é detetada em menos de uma hora após a infecção confirmando que o processo de ligação

e penetração do virião na célula hospedeira é rápido e eficiente quer em células permissivas ao vírus quer nas não permissivas. Esta fosfoproteína é o constituinte principal das partículas de CMV e é enviada para o núcleo das células logo após a fusão das membranas [52, 53].

No entanto, uma vez que a replicação produtiva é observada numa gama muito restrita de células humanas, provavelmente existe um mecanismo de restrição para a expressão de genes virais após a inserção do material genético em células não permissivas [54].

Durante uma infecção produtiva os genes virais são expressos numa cascata temporal sendo os primeiros genes virais a ser expressos denominados de imediatamente precoces (IE). Os genes virais mais abundantemente expressos nesta fase inicial são transcritos a partir do *locus major* IE que codifica para os produtos dos genes IE72 e IE86 [55]. Estes produtos são gerados após um evento de *splicing* diferencial e de poliadenilação de um transcrito primário, desempenhando um papel crucial no controlo da expressão viral e celular. O controlo da expressão celular ganha especial importância pois, deste modo o vírus pode replicar o seu DNA [55, 56, 57, 58, 59].

Após a expressão dos genes IE dá-se a transcrição dos genes virais precoces (E) e depois dos genes tardios (L). Os genes E geralmente, codificam para funções associadas à replicação do DNA viral e os L codificam para as proteínas estruturais do vírus. A expressão dos genes E e L são dependentes da expressão dos genes IE (Figura 4).

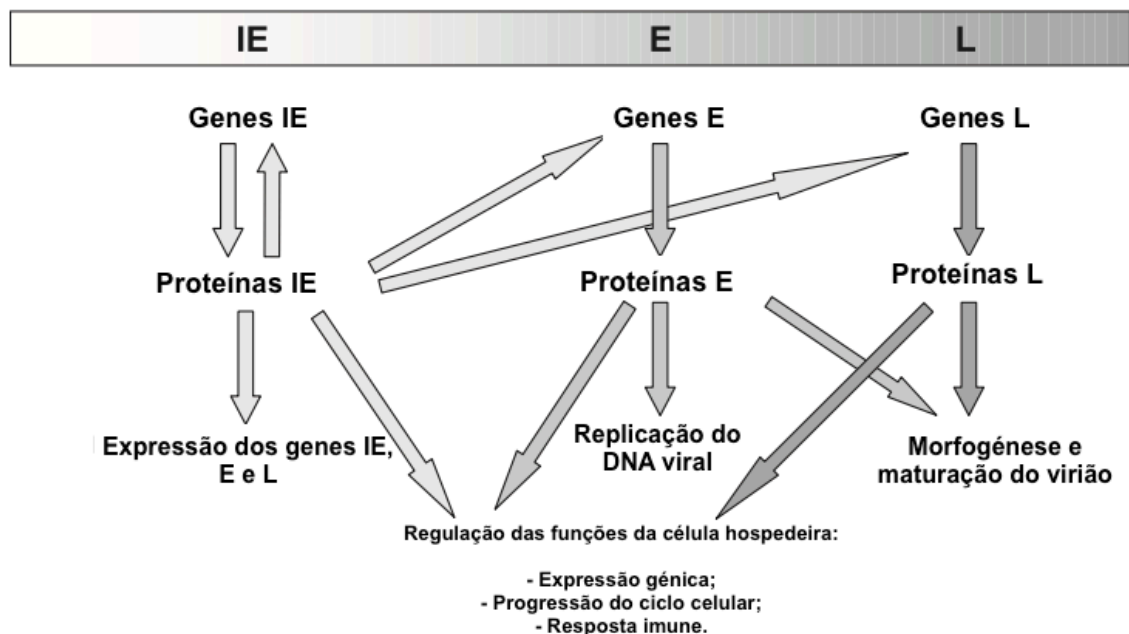


Figura 4 – Expressão dos Genes IE, E, L e função das proteínas por eles codificadas durante uma infecção produtiva [29].

Os processos de replicação, inversão, e de “empacotamento” do genoma ocorrem no núcleo das células infetadas sendo que a síntese do DNA viral é detetada 16 horas após a entrada do vírus. Para que o processo de síntese se dê é necessário a atividade das proteínas virais essenciais e específicas bem como a participação ativa de várias proteínas celulares [29].

No entanto, uma propriedade biológica interessante do CMV, comum a todos os herpesvírus e com importância clínica, é a capacidade do vírus permanecer latente no interior do hospedeiro após uma infecção primária, normalmente assintomática. Uma teoria consensual é de que o vírus permanece latente em monócitos, a partir do qual se distribui para vários órgãos do hospedeiro. O estado de latência representa o bloqueio da produção de vírus a nível da expressão dos antígenos da fase IE. Este bloqueio ocorre até à diferenciação dos monócitos ou quando a infecção latente pode ser ativada para produzir uma infecção lítica [60].

1.2.4 Diversidade em hospedeiros humanos

Estudos publicados há mais de 30 anos, baseados em métodos de digestão enzimática e subsequente sequenciação, mostraram níveis de diversidade genética no CMV, de indivíduo para indivíduo (diversidade inter-hospedeiro) [61]. Estes resultados foram confirmados mais tarde por re-sequenciação de diferentes *loci*, principalmente genes que codificam para as glicoproteínas gB, gN e gO, e de genomas completos provenientes de amostras clínicas depositados em bases de dados [62, 63]. Para além disso, estudos mais recentes, recorrendo aos mais variados métodos como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) [64], sequenciação de DNA [65], e HMA (*heteroduplex mobility assay*) [66], apontam para uma diversidade semelhante dentro do mesmo indivíduo (diversidade intra-hospedeiro). Com efeito, estas técnicas demonstraram que ¼ das infecções por CMV seriam mistas (detetado mais que um genótipo), numa ampla variedade de populações, incluindo crianças com infecção congénita, indivíduos com HIV, transplantados ou mesmo crianças e adultos imunocompetentes [67].

Em 2010, um estudo de genotipagem demonstrou a verdadeira dimensão da diversidade intra-hospedeiro, recorrendo a uma técnica de pirosequenciação ultra-profunda para estudar as gO, gN e gH em transplantados infetados com CMV. Estes autores

concluíram que em todos os pacientes incluídos no estudo foi detectada a presença de infecções mistas, sendo num dos casos encontrados 6 genótipos distintos. Concomitantemente, quase todas as ORFs do genoma de CMV exibiram um alto nível de diversidade genética intra-hospedeiro [68].

É importante salientar que a diversidade deste vírus foi descrita quantitativamente utilizando variáveis métricas, mostrando que esta diversidade rivaliza com alguns vírus de RNA, a referência em termos de altas taxas de diversidade das suas populações virais.

Tendo em conta os elevados níveis de diversidade intra-hospedeiro, a análise e compreensão da origem desta heterogeneidade tornou-se relevante. Atualmente, não existe nenhum mecanismo claro que explique a variabilidade observada, embora alguns autores avancem com explicações acerca de determinados mecanismos isolados que podem contribuir para essa diversidade [69].

Elevados níveis de replicação durante a infecção primária podem contribuir para a formação de novas mutações num hospedeiro, muito embora o número de erros gerados seja limitado pela atividade de *proofreading* da DNA polimerase viral [70]. Contudo, analisando amostras clínicas contendo CMV é possível observar a existência de divergência de clones em relação aos membros da população viral pré-existente, resultado consistente com casos de reinfeção [69].

As reinfeções a CMV parecem ser comuns quer em imunocomprometidos quer em indivíduos saudáveis [71, 72, 73]. Na realidade, este tipo de infecções em algumas populações estudadas podem ocorrer a uma taxa anual de 10%, comparável à taxa de surgimento de novas infecções [74]. Deste modo, as reinfeções oferecem uma possibilidade de introduzir maior diversidade intra-hospedeiro, no entanto este mecanismo não explica a diversidade observada em indivíduos muito jovens, nomeadamente recém-nascidos com infecção congénita. Neste tipo de infecção, a explicação pode passar pela transmissão transplacentária. Alguns autores demonstraram a existência de uma espécie de “efeito de gargalo” durante a transmissão materna para o feto, ou seja, apesar da mãe poder estar infetada com mais que uma estirpe, apenas uma parte desta população seria transmitida, dando origem a infecção congénita [75]. Desconhece-se, no entanto, se este mecanismo contribui para a diversidade deste vírus em outros contextos de transmissão, tais como, em crianças e adultos saudáveis. Outros

mecanismos como recombinação e seleção natural também podem alterar a diversidade intra-hospedeiro [69].

1.2.5 Epidemiologia: No Mundo e em Portugal

O CMV é um agente patogénico de importância significativa que infeta a maior parte da população mundial podendo ser encontrado quer em sociedades industriais desenvolvidas quer em grupos indígenas isolados [76, 77]. A título de exemplo, a prevalência de infeção por CMV nos Estados Unidos da América varia de 30% a 90% nos adultos [78].

Após a infeção o vírus é excretado em fluidos corporais (urina, saliva, lágrimas, sémen, leite e secreções cervicais) durante meses ou mesmo anos provocando geralmente sintomatologia leve ou mesmo subclínica. Sob estas condições o hospedeiro insuspeito é capaz de transmitir o vírus tanto vertical como horizontalmente, podendo causar infeção primária, reinfeção ou reativação [79, 80].

Na infeção congénita, o CMV surge como o principal agente, com uma incidência mundial que varia de 0,2% a 2,2% do total de nascimentos. A morbilidade e a mortalidade associadas a infeção congénita são reconhecidas com um problema de saúde pública, dado o espectro de síndromes de CMV e doenças associadas, com elevados custos relacionados com o tratamento de crianças infetadas e com o apoio social inerente para a criança e para o cuidador familiar [81, 82].

Cerca de 10% das crianças são infectadas até aos 6 meses de idade, por transmissão da mãe através da placenta, durante o parto, ou por amamentação [83]. A infeção transplacentária pode ocorrer tanto em mulheres infetadas pela primeira vez, durante a gravidez, como em mulheres que já estariam infetadas antes da concepção (infeção recorrente). A taxa de infeção primária durante a gravidez varia entre 0,7% e 4,1%, com uma transmissão transplacentária em 20% a 40% destes casos. Altas taxas de infeção congénita são observadas em populações com maiores taxas de seropositividade materna (Figura 5), confirmando o papel que as infeções recorrentes têm neste contexto [84, 85].

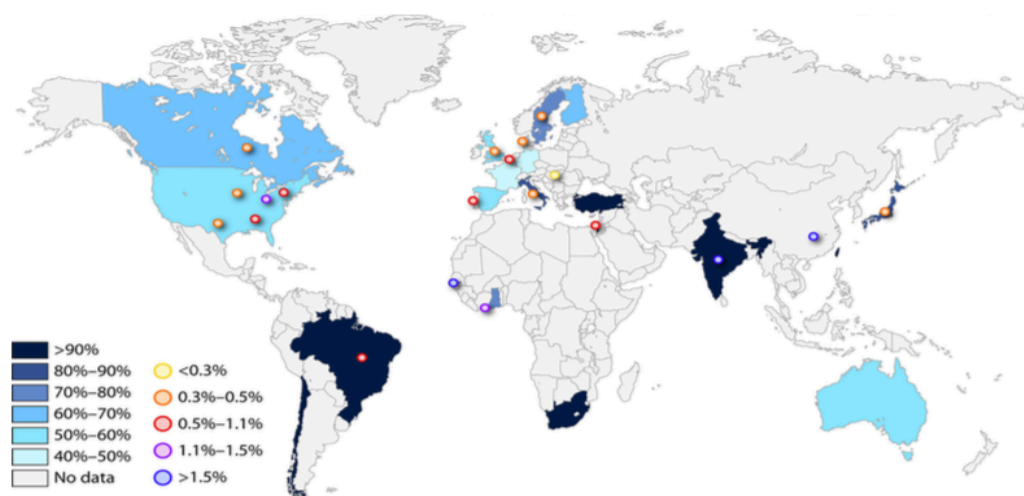


Figura 5 – Taxa de seroprevalência para CMV em mulheres em idade fértil (12 - 49 anos) e prevalência de infecção congénita ao nascimento.

As taxas de seroprevalência (sombreado) foram obtidas pela soma do número de mulheres seropositivas de todos estudos feitos dentro de um determinado país, dividido pelo número total de mulheres testadas (só foram incluídos os países com 500 mulheres testadas).

A prevalência de infecção congénita ao nascimento (círculos) foi obtida a partir dos estudos com uma amostra representativa (≥ 1000 recém-nascidos estudados) e cujos métodos de deteção foram o PCR ou a cultura da urina ou da saliva, com exceção dos Países Baixos e Portugal, que utilizaram amostras de sangue seco (*Guthrie Cards*) [84].

Em Portugal não existem muitos dados epidemiológicos contudo, merece particular destaque um estudo, no âmbito do 2º Inquérito Serológico Nacional, que teve como objetivo a caracterização do estado imunitário da população residente em Portugal Continental permitindo conhecer a prevalência de CMV no país. Os resultados indicam que a infeção por este vírus tem uma alta prevalência na população estudada (77%) e ocorre sobretudo nos primeiros anos de vida. No entanto, a partir do grupo etário dos 10 aos 14 anos, verificou-se um aumento da prevalência em indivíduos do sexo feminino. Dos 20 aos 29 anos, 24,5% das mulheres são suscetíveis para o CMV e dos 30 aos 44 anos essa suscetibilidade fixa-se nos 18,5%, o que pode ser encarado como um considerável risco para a existência de infeções congénitas [88].

Segundo estudos efetuados por diferentes grupos de trabalho portugueses, a proporção da infeção congénita pelo CMV, numa população da região de Lisboa e numa população da Beira Interior, utilizando o método de referência (deteção de vírus na

urina pelo método de cultura *shell-vial*) foi de 0,7% e 0,4%, respetivamente [82, 88]. Paixão e colaboradores, utilizando uma técnica de PCR em amostras de sangue seco obtidos dos *Guthrie Cards*, encontraram uma prevalência da infeção congénita por CMV de 1,1% em Portugal Continental e Ilhas [89].

1.3 Clínica associada à infeção citomegálica

O CMV, normalmente, não causa sintomatologia evidente após uma infeção primária num indivíduo imunocompetente, mas essa sintomatologia é muito mais provável quando a infeção ocorre em imunocomprometidos, particularmente em transplantados e portadores de HIV [90, 91]. A transmissão transplacentária durante a gravidez (infeção congénita) ou infeção neonatal de recém-nascidos prematuros é igualmente um problema sério, podendo originar danos neurológicos, manifestando-se sob a forma de surdez ou deficiência mental no início de vida dos recém-nascidos [29]. Além disso, é o principal agente causador de anomalias na altura do nascimento [76, 77].

Dos recém-nascidos infetados por CMV, 5 a 10% exibem CID, cujos sintomas incluem retardamento do crescimento intrauterino, icterícia, hepatoesplenomegália, trombocitopénia, petéquias, coriorretinite e hepatite, juntamente com o envolvimento do sistema nervoso central na forma de microcefalias, encefalites, convulsões e sinais neurológicos focais. A maioria das manifestações fora do sistema nervoso central (como por exemplo, no fígado) são autolimitados no tempo e podem não requerer terapêutica. Em contraste, os danos neurológicos podem ser permanentes e contribuem para a morbilidade a longo prazo sendo de mau prognóstico de CID. Estudos prospetivos a longo prazo indicam que 80% das crianças com infeção congénita sintomática irão exibir graves anormalidades neurológicas ao longo da vida. Os mesmos estudos demonstraram que 15% dos recém-nascidos assintomáticos ao nascimento podem desenvolver defeitos auditivos ou desempenho intelectual afetado [28, 92].

No que toca à infeção perinatal o tempo de incubação varia entre 4 e as 12 semanas. A quantidade de vírus excretados pelos recém-nascidos com este tipo de infeção é menor em comparação com a infeção congénita, contudo são ambas crónicas com a excreção viral a durar anos. A maioria dos recém nascidos não prematuros são assintomáticos, pois estes recebem IgGs maternos. Por outro lado, 15-25% dos recém-nascidos

prematturos podem desenvolver sintomatologia severa [85].

1.4 Diagnóstico Laboratorial

1.4.1 Isolamento do vírus

O método de referência para a detecção de CMV, apesar do avançar da tecnologia, continua a ser o isolamento do vírus através da cultura celular convencional [67]. Esta abordagem, consiste na utilização de amostras clínicas, nomeadamente urina, saliva e sangue que são inoculadas em fibroblastos humanos seguindo-se um período de incubação de 2 a 21 dias [93]. Após esse tempo, se a amostra for positiva, os fibroblastos vão exibir o efeito citopático provocado pelo CMV (Figura 6), estando esta característica diretamente relacionada com o título de carga viral. Contudo, este método é lento, sendo necessárias 2-3 semanas até um resultado ser considerado negativo [67]. Em alternativa, a técnica de *shell vial* permite a identificação precoce (a partir das 16h de incubação) de antígenos virais nas culturas celulares, existindo um passo de centrifugação inicial que vai auxiliar na adsorção do vírus aos fibroblastos dispostos em monocamada, ou seja, vai aumentar a infetividade do inóculo viral, e com isso diminuir o tempo necessário à detecção do vírus. Os antígenos virais são detetados através da utilização de anticorpos monoclonais direcionados contra as proteínas IE do vírus por técnicas de imunofluorescência [94, 95].

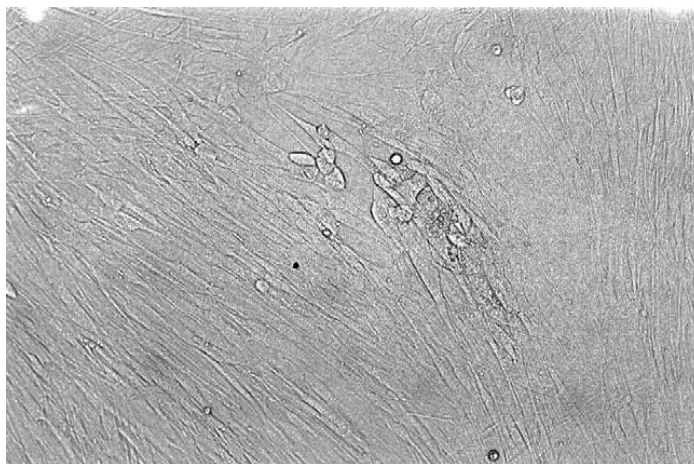


Figura 6 – Efeito citopático provocado por CMV em fibroblastos [93].

1.4.2 Serologia

Os testes serológicos possuem maior importância em rastreios, como por exemplo, na determinação do estado imunitário de uma grávida ou na distinção de uma infecção primária ou antiga, através da análise da presença ou ausência de IgG e IgM contra o CMV num indivíduo [67]. Estão descritas várias abordagens para a deteção deste tipo de anticorpo, podendo ser destacadas as técnicas de fixação do complemento, hemaglutinação indireta e de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), sendo esta última a mais utilizada [96].

De uma maneira geral os *kits* comerciais utilizam técnicas sensíveis para a deteção da IgM, mas existe o problema da falta de especificidade na infecção primária devido à persistência deste tipo de anticorpo durante meses após uma infecção por CMV, para além da reatividade cruzada que acontece com outros agentes. Desta forma, existe uma fraca correlação nos resultados obtidos entre os diferentes *kits* comerciais que testam a IgM [97, 98].

Devido a todas estas limitações, o teste de avididade das IgG parece ser o método mais viável de distinção entre uma infecção antiga e primária. Baseando-se este teste no princípio de que nas primeiras semanas após uma infecção primária a IgG possui baixa avididade para o antígeno e de que por outro lado, a avididade aumenta fruto de uma maior maturação da resposta imune ao longo do tempo, sendo os resultados reportados como um índice de avididade que traduz a percentagem de IgG que se liga ao antígeno seguido de um tratamento com agentes desnaturantes [99].

1.4.3 Antigenémia

O método de antigenémia tem sido utilizado, desde há várias décadas, para quantificação de CMV em amostras de sangue. Nesta abordagem são utilizados anticorpos monoclonais que detetam o antígeno pp65, uma proteína estrutural expressa no interior dos leucócitos durante a fase precoce no ciclo de replicação do CMV. A contagem de leucócitos positivos é efetuada por técnicas de imunofluorescência [100].

Este teste não dá apenas uma informação qualitativa, através da quantificação pode estabelecer-se uma correlação entre a presença de núcleos infectados e a viremia

permitindo deste modo a monitorização de CMV, nomeadamente em imunocomprometidos [101, 102].

No entanto esta técnica apresenta algumas desvantagens como não ser possível automatizar, ser laboriosa e necessitar de pessoal treinado, podendo esta técnica ser afetada pela interpretação subjetiva do operador. De igual modo, as amostras têm de ser processadas no espaço de 6 horas sendo que uma maior demora no processamento traduz-se na redução da sensibilidade [103].

1.4.4 Métodos de Biologia Molecular

Métodos que utilizam a deteção de DNA de CMV são hoje em dia regularmente utilizados para diagnóstico de infeção por este vírus. Atualmente, dentro de outras técnicas de biologia molecular, a *polymerase chain reaction* (PCR) pode ser considerada como a *gold standard*, sendo o método mais rápido e sensível para deteção de CMV baseado na amplificação de ácidos nucleicos. Normalmente os alvos de amplificação são regiões conservadas dos genes que codificam para as proteínas IE e para as produzidas na fase tardia do ciclo replicativo do vírus. No entanto, existem muitos outros genes que podem ser utilizados para este propósito [67, 104].

A PCR pode ser qualitativa e/ou quantitativa, ou seja, para além da deteção de DNA é possível medir cargas virais em amostras clínicas. No caso da PCR em tempo real (PCRtr), a quantificação e deteção tornam-se especialmente vantajosas, por exemplo, em imunocomprometidos identificados como pacientes em risco de desenvolver doença associada ao CMV, que podem necessitar de terapia ou mesmo de avaliar a efetividade dessa mesma terapia, ao permitir uma contínua monitorização. Estes métodos moleculares são mais caros que por exemplo, uma antigenémia, mas são mais rápidos e automatizados. Os resultados são expressos em número de cópias ou Unidades Internacionais/mL de sangue ou plasma [105, 106, 107].

Para ensaio de PCR, o DNA viral pode ser extraído de sangue total, leucócitos, plasma ou qualquer outro tipo de tecidos (provenientes de biopsias) ou fluidos (urinas, lavados bronco-alveolares entre outros) [67, 108].

No âmbito da infeção congénita e aproveitando a recolha de sangue, que é colocado em papéis de filtro, de todos os recém-nascidos e que é realizada em alguns países para se proceder a uma triagem metabólica de rotina, tem existido um interesse crescente na

utilização de ensaios baseados na PCR para a detecção de CMV em amostras desse sangue seco. Este método traz algumas vantagens no rastreio de CMV em recém-nascidos, dado que as amostras já são recolhidos rotineiramente para triagem metabólica de todos os recém-nascidos [109, 110, 111, 112, 113].

A PCR conjuntamente com a transcriptase reversa (RT-PCR), permite detetar mRNA em leucócitos de sangue periférico independentemente da presença/ausência de DNA do vírus. Estudos demonstram que a ausência de mRNA está relacionado com a ausência de atividade do vírus, o que torna mais efetiva a interpretação de resultados segundo esta técnica, pois a PCR convencional quando aplicada a este tipo de vírus que têm a capacidade de permanecer em latência no hospedeiro, apenas nos garante a presença de DNA viral e não a sua viabilidade [114].

Uma outra técnica, a de amplificação NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*), está documentada como podendo ser mais sensível do que o ensaio de antigenémia para a detecção de infeção por CMV em sangue. Esta permite a amplificação isotérmica de mRNAs virais não excisados, podendo ser realizado em menos de 24 horas. O método é automatizado mas o procedimento de extração de mRNA pode ser laborioso e demorado [115, 116].

1.4.5 Imuno-histoquímica

O método de imuno-histoquímica é utilizado primariamente em amostras com tecidos ou fluidos. Este baseia-se no processo de localização de antígenos, explorando o princípio de ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. As lâminas são preparadas com secções congeladas de amostras de tecidos provenientes de biopsias ou por centrifugação de células sobre a lâmina. Posteriormente são aplicados anticorpos mono ou policlonais, contra as proteínas produzidas na fase precoce, ligados a uma molécula fluorescente ou a segundos anticorpos que, por sua vez estão ligados a enzimas seguindo-se por fim a visualização em microscopia de fluorescência. Esta técnica é mais sensível e muito específica comparada com a microscopia histológica simples, tendo contudo a desvantagem de ser uma técnica muito trabalhosa que requer experiência principalmente no que toca à leitura das lâminas [67, 117].

1.5 Genotipagem

Recentemente, com o desenvolvimento de métodos sensíveis que permitam a discriminação de diferentes estirpes de CMV, tornou-se cada vez mais evidente que quer as estirpes laboratoriais quer as de tipo selvagem apresentam variação genética substancial. A aplicação destes métodos, reforçou também a ideia de que, na generalidade das infeções provocadas por CMV, existe uma enorme variedade de genótipos, e não apenas um genótipo claramente definido [118].

Atualmente sabe-se que existem diferentes estirpes de CMV, com uma enorme variedade de possíveis combinações genotípicas ao longo de todo o seu genoma [119, 120], facto confirmado por sequenciação completa do genoma do vírus, num número limitado de estirpes [62, 63, 122, 123].

Como descrito em 1.1.3, a variabilidade genética do vírus está confinada a determinadas partes do genoma [122]. Estas variações têm sido o foco de investigação no que diz respeito à identificação de diferentes genótipos. Alguns dos genes variáveis, que têm servido como alvos de estudo, codificam para as glicoproteínas do invólucro que são essenciais para o ciclo replicativo viral. Contudo, existem outros genes de interesse para estudos de genotipagem, como por exemplo, o gene hipervariável UL139 que codifica para uma glicoproteína de membrana, sendo que as variações presentes neste gene podem ter o potencial de influenciar o curso de uma infeção [124].

Apesar da substancial variação de sequências entre as estirpes de CMV, para a maioria das regiões variáveis apenas um número limitado de genótipos pode ser definido a partir da análise destas [118].

Na maioria dos estudos de genotipagem, demonstra-se que não existe associação significativa de determinados genótipos com áreas geográficas específicas, embora a incidência destes possa diferir ligeiramente de local para local [125, 126, 127], estando a maioria dos genótipos discriminados até agora, provavelmente, distribuídos por todo o mundo [128, 129, 130, 131, 132].

Grande parte dos investigadores têm tentado compreender de que forma os diferentes genótipos de CMV podem influenciar a infeção viral ou a doença, motivados em parte pela intenção de encontrar possíveis factores prognósticos que poderiam prever a probabilidade e/ou gravidade da doença em indivíduos com HIV/SIDA, transplantados e recém-nascidos [118].

No âmbito da infecção congénita, estudos de genotipagem realizados em genes variáveis como o da gB, gN, UL144, entre outros, demonstram a possibilidade de cada genótipo poder ser transmitido verticalmente da mãe para o feto [127, 133, 134, 135, 136, 137]. Quanto à existência de uma correlação entre certos genótipos e maior patogenicidade, severidade da doença ou grau de sequelas, as análises baseadas no gene da gN ou no UL144 apontam para que algumas variantes destes possam estar relacionados com a evolução da infecção fetal. Arav-Boger e seus colaboradores mostraram que a infecção de um feto com o genótipo C do gene UL144, , detetados na urina ou saliva, podem estar significativamente associados a infecção fetal sintomática e também com a interrupção da gravidez. Por outro lado, fetos infetados com o genótipo mais comum (genótipo B) têm melhor prognóstico de infecção congénita [133, 138]. Um outro estudo, mais recente, confirma a presença de genótipos A e C em recém-nascidos com infecção congénita severa [139].

Outros autores contudo, ao analisarem amostras de líquido amniótico, não conseguiram estabelecer correlação entre os diferentes genótipos do mesmo gene (UL144) e mau prognóstico da infecção congénita [134].

Outras publicações baseiam-se na análise dos genótipos do gene UL55, que codifica para a gB, a maior proteína imunodominante do CMV, tentando perceber o seu impacto em sintomatologia mais severa. Esta glicoproteína é expressa sob a forma de uma molécula precursora que posteriormente sofre glicosilação e clivagem proteolítica (no codão 460 ou 461), formando um complexo dissulfídrico com 2 subunidades: a de superfície (gp58) e a transmembranar (gp116) [140, 141].

Estudos realizados em isolados clínicos demonstraram uma variação de sequências restritas a um número limitado de genótipos da gB. Chou e Dennison classificaram esses isolados em 4 grupos distintos, cada um com uma sequência nucleotídica e peptídica característica. Desta maneira, propuseram um esquema de genotipagem que emprega uma dupla digestão por enzimas de restrição (HinfI e RsaI), reconhecendo sequências específicas entre os nucleótidos 1344 e 1440. Este passo é precedido por uma amplificação do fragmento que corresponde à zona de clivagem proteolítica (CLZ) da gB (Figura 7) [142]. Existem, portanto, 4 genótipos mais comuns (gB1 ao gB4) determinados. Contudo, mais genótipos foram descritos, como o gB5 [143], o gB6 e o gB7, embora estes 3 genótipos não sejam consensualmente aceites [66].

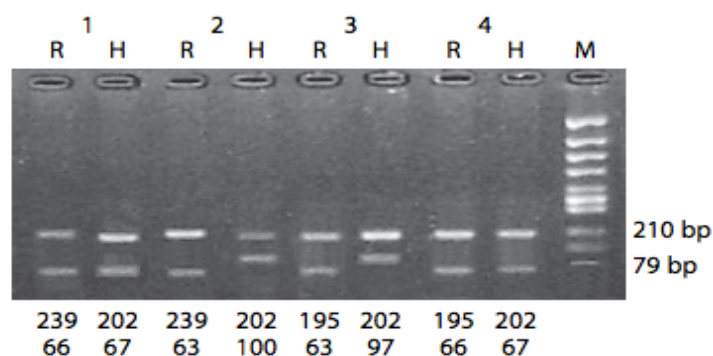


Figura 7 – Resultado do perfil de bandas obtido por PCR-RFLP. (1) genótipo gB1, (2) genótipo 2, (3) genótipo 3, (4) genótipo 4. R= Produto de PCR hidrolisado por RsaI; H= Produto de PCR hidrolisado por HinfI; M= Marcador de massa molecular [135].

Estudos publicados, com o objetivo de estabelecer associação entre os gB1, gB2, gB3 e gB4 e a patogenicidade, obtiveram resultados discrepantes, sendo que a maioria dos autores refere que estes não desempenham um papel significativo na determinação do grau de infecção fetal ou nas suas sequelas [125, 135, 144, 145, 146]. Todavia, parece existir uma correlação entre determinados genótipos da gB e a expressão clínica em imunocomprometidos. Presume-se que neste contexto, diferentes genótipos possam ter diferentes tropismos, nomeadamente, e a título de exemplo, está demonstrado que o gB2 é detetado frequentemente em casos de encefalite ou retinite a CMV, em indivíduos infetados com HIV em fase SIDA [147, 148].

Recentemente, estudos analisando o gene da gN, detetaram uma correlação entre determinados genótipos e sintomatologia aquando do nascimento e posteriores sequelas. Assim, o risco de o recém-nascido ter sequelas típicas de infecção congénita é 8 vezes superior quando este está infetado com o gN4, observando-se uma redução de risco de sequelas quando existe infecção com gN1 ou gN3 [137].

Considerando o fundo genético variável das estirpes de CMV, pode não ser possível prever o impacto que este vírus pode ter no hospedeiro, se apenas for estudado um gene. Assim, pelo menos, os genótipos de diferentes genes devem ser determinados simultaneamente. Para além disto, há ainda a possibilidade de no hospedeiro humano poder existir, ao mesmo tempo, mais do que um genótipo de CMV (>1 genótipo) [118]. A infecção mista pode ocorrer mesmo num hospedeiro imunocompetente. Esse facto foi demonstrado em mulheres atendidas num ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis [149] e em tecidos *post mortem* de indivíduos imunocompetentes [150].

Diferentes abordagens de genotipagem foram estabelecidas para detetar genótipos ou misturas de genótipos de CMV em amostras clínicas, normalmente utilizam-se técnicas de PCR de largo espectro que amplificam regiões conservadas que flanqueiem uma região variável ou técnicas de sequenciação. Todos estes métodos baseiam-se no conhecimento de que:

- As regiões variáveis são frequentemente flanqueadas por sequências altamente conservadas
- A diversidade de sequências, em quase todas as regiões variáveis do genoma de CMV, traduz-se num número limitado de genótipos;
- Dentro de cada genótipo existe uma elevada estabilidade na região variável [122].

1.5.1 Baseada em técnicas de PCR

A PCR permite a amplificação de milhões de cópias idênticas a partir de uma pequena quantidade inicial de DNA presente numa amostra clínica. Numa primeira etapa o DNA alvo é desnaturado a altas temperaturas ($\sim 95^{\circ}\text{C}$). De seguida, *primers* específicos são hibridados a uma temperatura mais baixa ($\sim 60^{\circ}\text{C}$), sendo que por fim existe uma fase de extensão durante a qual a enzima DNA polimerase produz cópias a partir da cadeia molde (72°C), sendo este ciclo repetido, geralmente 30-40 vezes.

A alta sensibilidade e versatilidade desta técnica aliada à rapidez de análise, permite a sua utilização na genotipagem, no entanto, a deteção de determinados genótipos pode ser subestimada, nomeadamente se a carga viral correspondente não for a suficiente [151].

A deteção pela técnica clássica de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), antecedida de uma passo de PCR, possui igualmente uma sensibilidade limitada para genótipos com baixa abundância, no entanto, acoplando este método a uma eletroforese capilar, ao invés da utilização do gel de eletroforese convencional, há um aumento da capacidade de deteção para este tipo de genótipos [152].

Abordagens alternativas de genotipagem têm sido desenvolvidas nos últimos anos para melhorar a deteção dos genótipos: ensaios de hibridação com sondas, ensaios de PCR e

ensaios de PCRtr, nestas técnicas a especificidade e sensibilidade foram melhoradas pela utilização de reagentes específicos para cada genótipo.

Métodos de PCR específicos para cada genótipo, como a *multiplex* PCR utilizando *primers* e sondas específicas são altamente adequados para a genotipagem de infecções mistas sendo capazes de detetar de forma fiável genótipos de baixa abundância, isto é, com uma frequência inferior a 5% [64, 147, 148].

Atualmente a PCRtr é um dos métodos mais utilizados na genotipagem. Nesta técnica, são utilizadas sondas, desenhadas para a sequência do fragmento alvo, contendo um corante fluorescente ligado ao terminal 5' (*reporter*) e um inibidor da fluorescência (*quencher*) ligado ao terminal 3'. Nestas sondas de hidrólise (por exemplo, TaqMan[®]), durante o processo de amplificação a sonda hibrida na região específica do produto amplificado; após o que o *reporter* e o *quencher* são separados ocorrendo assim a emissão de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade do DNA alvo presente na amostra. O ponto em que a fluorescência ultrapassa o nível do “background” é designado como *threshold cycle* (Ct) sendo, este o valor utilizado no cálculo da quantidade de DNA durante uma PCRtr quantitativa [153]. É um método rápido, que permite a análise em simultâneo de um maior número de amostras, sendo também mais sensível (na generalidade dos casos) e específicos em comparação com os outros métodos de PCR. A PCRtr permite igualmente determinar e quantificar cada genótipo de forma individual dentro de uma infecção mista. No entanto, as mutações nos sítios de ligação dos *primers* e/ou de ligação da sonda pode levar a que o número de genótipos presentes possa ser subestimado [154, 155].

1.5.2 Baseada na Sequenciação

Desde o início dos anos 90, a sequenciação de DNA tem sido quase exclusivamente realizada por métodos capilares, ou por semi automatização da técnica original de Sanger [156, 157]. Em linhas de produção de alto rendimento, o DNA a ser sequenciado pode ser preparado por uma de duas abordagens, pelo método de *shotgun* (o DNA é aleatoriamente fragmentado e clonado num plasmídeo capaz de gerar muitas cópias, este plasmídeo é utilizado para transformar a *Escherichia coli*), ou por amplificação por PCR efetuada com *primers* que flaqueiam a sequência alvo. O objetivo principal destas

duas abordagens é a obtenção de uma grande quantidade de DNA, para servir de molde ao passo de sequenciação [158].

A fase de sequenciação tem lugar segundo uma reação designada por “ciclo de sequenciação” constituída por ciclos de desnaturação, hibridação dos *primers* e extensão. Cada ciclo de extensão é terminado com a incorporação de um didesoxinucleótido (ddNTPs) fluorescente. Estes nucleótidos são terminadores de cadeias porque não possuem o grupo 3'-OH, necessário para a formação de uma ligação fosfodiéster entre dois nucleótidos, fazendo com que a DNA polimerase cesse a sua função. Neste caso, a marcação de cada um dos ddNTPs com diferentes corantes fluorescentes ddNTPs, permite que a sequenciação se processe numa única reação, uma vez que, cada corante emite luz com diferentes comprimentos de onda. Em todo este processo, existe um *software* que faz corresponder cada fluorescência a uma base nucleotídica [159].

Após 3 décadas de melhorias graduais, atualmente, esta técnica permite obter leituras de comprimentos de DNA até 1.000pb com uma precisão de 99% [158]. Entretanto, surgiu uma nova alternativa, a *Next-generation sequencing* (NGS), uma segunda geração de sequenciação de DNA, também conhecida como sequenciação de alto rendimento podendo esta ser agrupada por diversas categorias: sequenciação por terminação ciclo-reversível (Solexa-Illumina), pirosequenciação (Roche), sequenciação por ligação de sondas (Applied Biosystems), ou por *Ion Torrent* (Applied Biosystems), entre outras tecnologias. Embora as plataformas existentes sejam bastante diversificadas, as bases de amplificação e sequenciação são conceitualmente semelhantes [159, 160].

Como primeiro passo, existe a construção de uma biblioteca genómica, que é realizada por fragmentação aleatória do DNA ou cDNA, seguido de uma ligação *in vitro* de adaptadores genéricos. A subsequente formação de produtos de amplificação por clonagem pode ser conseguida por diversas técnicas, por exemplo, PCR em emulsão [161] ou amplificação em fase sólida (PCR em ponte) (Figura 8) [162, 163]. A título de exemplo, na tecnologia da Solexa-Illumina, depois de criada a biblioteca genómica, os diversos fragmentos de DNA são introduzidos numa célula de fluxo, onde estes vão ser capturados num suporte sólido coberto de oligonucleótidos complementares aos adaptadores genéricos. De seguida, é realizado um ciclo de PCR que cria uma cadeia complementar à original que, por sua vez, está ligada covalentemente ao suporte.

Posteriormente, são realizados vários ciclos de PCR para criar *clusters* de sequências iguais (PCR em ponte). Uma vez formados os *clusters*, as sequências complementares à original são removidas para que cada *cluster* tenha apenas uma sequência [159, 164]. Na tecnologia da Roche, o DNA é hibridado com *primers*, que se ligam a microesferas que contêm na sua superfície uma cadeia complementar a um desses *primers*, criando condições para que cada microesfera receba apenas um fragmento. De seguida, forma-se uma emulsão de forma a encapsular as microesferas realizando-se de seguida várias rondas de PCR até que a superfície da microesfera esteja coberta com cópias do fragmento original [158, 162].

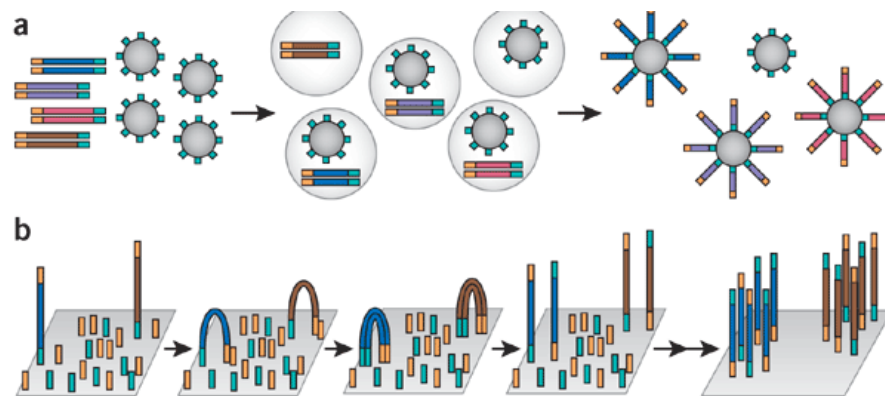


Figura 8 – Esquema representativo da fase de amplificação da NGS. (a) amplificação por PCR em emulsão; (b) amplificação por PCR em forma de ponte [Adaptado de 158].

Ao contrário das duas tecnologias anteriores, a de *Ion Torrent* não utiliza sinais óticos. Esta técnica explora a libertação de um ião H^+ quando se dá a adição de um dNTP a um polímero de DNA.

Tal como em outros tipos de NGS, o DNA ou RNA é fragmentado (~200-300bp). Adaptadores são adicionados a uma molécula de DNA que por sua vez, é ligada a uma microesfera. Tal como na pirosequenciação, a amplificação é realizada em emulsão. No final do processo, as microesferas são carregadas em poços num *chip* semiconductor [165].

No fase de sequenciação, a placa é lavada sucessiva e ordenadamente com soluções contendo um dos 4 nucleótidos, de cada vez que é incorporado um nucleótido há a libertação de um ião H^+ que leva a uma alteração do pH do poço. Os dNTPs não incorporados são lavados e o processo é repetido com um outro nucleótido diferente. Essa alteração do pH é convertida numa diferença de potencial que é diretamente

proporcional ao número de nucleótidos adicionados. O facto de ser medida uma voltagem em vez de uma intensidade de luz torna a sequenciação mais fiável, barata e rápida [159] (Figura 9).

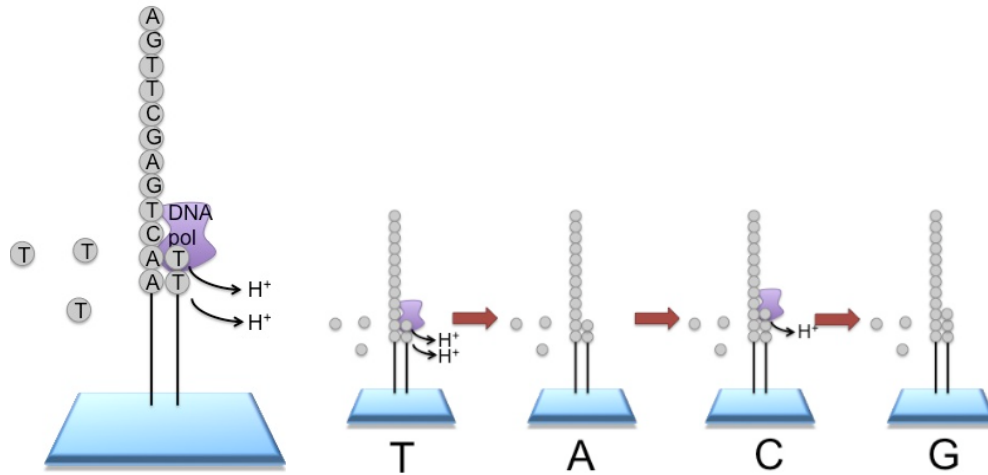


Figura 9 – Esquema representativo da fase de sequenciação, na tecnologia de *Ion Torrent* [Adaptado de <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/ion-torre>].

Atualmente as técnicas de NGS são das mais sensíveis permitindo uma análise quantitativa das diferentes populações genótípicas do CMV, mesmo os genótipos com baixa abundância (frequência inferior a 1% da população total) podem ser detetados. Uma vez que estes métodos detetam variações em toda a região amplificada é especialmente útil para a genotipagem de locais altamente variáveis que apresentem um grande número de genótipos, como é o caso do gene da gN [68]. No entanto, para utilizar todo o potencial destes métodos, é necessária uma grande quantidade de DNA, para que deste modo o passo de PCR assegure uma amplificação eficiente destes genótipos.

Estes métodos são dispendiosos e laboriosos, sendo estes dois factores limitantes para a sua ampla utilização [166].

1.6 Objetivos do trabalho experimental

O objetivo principal deste estudo foi determinar quais os genótipos presentes em amostras de urina e líquidos amniótico, provenientes de casos confirmados ou de suspeitas de infeção congénita e/ou perinatal por CMV, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Pretendeu-se igualmente confirmar a presença de infeções congénitas mistas, assunto recente e controverso na literatura.

Paralelamente ao estudo foram incluídas amostras de *follow up* com o propósito de avaliar a estabilidade genotípica ao longo tempo, na infeção congénita.

Numa segunda fase pretendeu-se confirmar os resultados da técnica de PCR em tempo real recorrendo a outros métodos (Sequenciação por método de Sanger, *Next-Generation sequencing* e Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição).

O interesse nesta temática fundamenta-se na inexistência de estudos de genotipagem para CMV no contexto da infeção congénita em Portugal. Esta área de estudo tem sido abordada noutros países, no entanto, o impacto dos diferentes genótipos na severidade da infeção congénita está longe de ser consensual. Por outro lado, o mecanismo de interação do CMV com o hospedeiro humano não é totalmente compreendido, assim como, os factores responsáveis pela sua imensa diversidade genómica.

Por tudo o que foi referido, estudos neste domínio são revelantes para melhorar o conhecimento necessário para, por exemplo, a produção de vacinas que previnam a infeção congénita provocada por este agente.

2. Material e Métodos

2.1 População em estudo

Para este estudo foram selecionadas as amostras positivas para CMV armazenadas a -80°C na Unidade de Infecção: etiologia, patogênese e bases terapêuticas da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, desde Novembro de 2009 a Janeiro de 2016.

Foram selecionadas, no total, 36 amostras de urina colhidas em recém-nascidos e lactentes com idades compreendidas respetivamente entre o primeiro dia de vida e as 4 semanas e entre 4 semanas e os 18 meses de idade (Figura 1). Foram também incluídos 20 amostras de líquido amniótico (LAs) sob as mesmas condições.

Caracterização da População

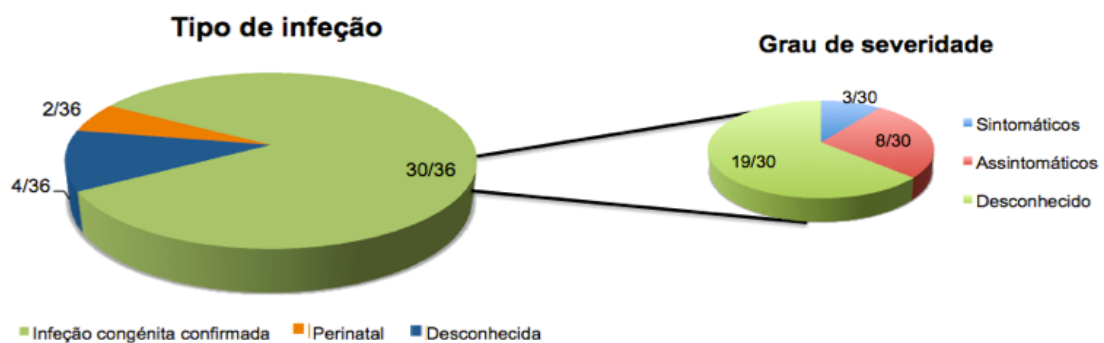


Figura 1 – Distribuição por tipo de infeção nas amostras de urina analisadas (n=36) e respectiva distribuição do grau de severidade nas infeções congénitas confirmadas (n=30).

Paralelamente ao estudo, foram incluídos *follow up* de 9 recém-nascidos com infeção congénita (urinas colhidas em alturas diferentes para cada individuo): 7 amostras com apenas um *follow up*, 1 amostra com dois *follow up* e 1 outra amostra com três (Tabela 1).

Tabela 1 – *Follow up* dos recém-nascidos incluídos no estudo (n=12). A periodicidade de recolha das amostras não segue um padrão definido, variando entre os 2 dias e 18 meses.

Data da colheita das amostras de urina				
Amostra Inicial	Até ao 1º Mês	Do 1º ao 6º mês	Do 6º ao 12º mês	Do 12º ao 18º mês
U23			X	
U49		X		
U58			X	
U83	X			
U111	X ^a	X		
U232			X	X
U257				X
U264	X			
U374	X			

^a 2 amostras de urina colhidas, a primeira ao 3º dia e a segunda ao 30º dia.

2.2 Processamento das amostras

2.2.1 Extração do DNA

Na extração de DNA utilizou-se o *kit* comercial *JetQuick*® Blood & Cell Culture DNA (Genomed), executou-se o protocolo estabelecido pelo fabricante com ligeiras modificações, assinaladas a negrito:

- Pipetar 200µl da amostra para um tubo de 1,5mL;
- Adicionar 20µl de protease [20mg/mL], 10µl de RNase [20mg/mL] e 200µl de tampão K1;
- Agitar no vortex. **Fazer um spin**;
- Incubar durante 10 minutos a 58°C. **Fazer um spin**;
- Adicionar 200µl de Etanol absoluto à mistura. Agitar no vortex. **Fazer um spin**;
- Colocar a coluna num tubo de recolha de 2ml. Transferir para a coluna a totalidade da mistura obtida anteriormente;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente;
- Descartar o filtrado;
- Adicionar 450µl de tampão KX;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente;
- Descartar o filtrado;

- Adicionar 450µl de tampão K2;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente;
- Descartar o filtrado;
- Centrifugar a coluna vazia à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente para secar a sílica;
- Colocar a coluna num tubo de 1,5ml;
- Adicionar 50µl de Tris-HCl, pH 8,5 [10mM] (depois de pré-aquecido a 70°C durante 1 minuto);
- Deixar repousar durante 2 minutos;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 2 minutos à temperatura ambiente;
- **Efetuar uma segunda eluição com os 50µl de extraído eluído no passo anterior (pré-aquecido a 70°C);**
- **Centrifugar à velocidade máxima durante 2 minutos à temperatura ambiente;**
- Armazenar o DNA extraído a -20°C.

2.2.2 PCR em tempo real

2.2.2.1 Quantificação da carga viral total


A quantificação da carga viral total foi realizada no sistema de detecção ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) utilizando *primers* e sondas específicos para o gene UL83, que codifica para a fosfoproteína pp65 do CMV. No final da reação obteve-se um produto amplificado de 283 pares de bases (pb) (Tabela 2).

Foram utilizadas sondas TaqMan[®]MGB (*Minor Groove Binder*) com o fluoróforo 6FAM na extremidade 5'. A reação de PCR foi realizada numa placa com 96 poços num volume total de 25µl contendo 5µl de suspensão de DNA extraído, enzima TaqMan Universal PCR Master Mix [2X] (Applied Biosystems), *primers* CMVR e CMVF [10µM] e sonda [10µM] (Invitrogen). Todas as amostras foram testadas em duplicado.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* e sonda utilizados para amplificação e detecção do gene UL83 [89].

Descrição	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>Primer Forward</i> (CMVR)	CCCTCCggCAA _g CTCTTT	283
<i>Primer Reverse</i> (CMVF)	CAggTCCTCTTCCACgTCA _g A	
Sonda	TgCACgTCACgCTgg	

A reação de amplificação foi realizada com as seguintes condições:

	1 ciclo	95°C a 10 minutos para desnaturação inicial
	40 ciclos	95°C a 15 segundos para desnaturação 60°C a 1 minuto para hibridação/extensão

Foi utilizada uma curva padrão construída a partir de diluições seriadas de DNA extraído de uma estirpe padrão de CMV (AD169). Com o resultado das leituras dessa curva foi construído um gráfico com o valor Ct.

2.2.2.2 Genotipagem

A genotipagem do gene UL55 que codifica para a glicoproteína B do CMV, foi realizada no sistema de detecção anteriormente referido utilizando *primers* e sondas específicos de cada genótipo (gB1, gB2, gB3 e gB4) (Tabela 3).

A reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo anteriormente descrito (2.2.2.1) sendo que todas as amostras foram testadas em duplicado.

Foram utilizadas sondas TaqMan[®]MGB possuindo na extremidade 5' o fluoróforo 6FAM[™] (gB1, gB3, gB4) e fluoróforo VIC[™] (gB2).

Tabela 3 – Sequência dos *primers* e sondas utilizados para amplificação e detecção dos diferentes genótipos da gB [167].

Genótipos e descrição de <i>primers</i> e sondas	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
gB1		
<i>Forward</i>	CATACgACgTCTgCTgCTCACT	72
<i>Reverse</i>	gCTgACCGTTTgggAAgAAg	
Sonda	TCgATCCggTTCAgTCTCT	
gB2		
<i>Forward</i>	TCTTTggTggAATTggAACgT	79
<i>Reverse</i>	TgTCACTCgTACTTCTTCTggTCCTA	
Sonda	ATCCAgTCTgAATATCA	
gB3		
<i>Forward</i>	TgTTggAACTggAACgTTTgg	72
<i>Reverse</i>	TgCCCgTACTTCTCTTggTTCT	
Sonda	CggTgTgAACTCCA	
gB4		
<i>Forward</i>	AAACgTgTCCgTCTTCgAAACT	75
<i>Reverse</i>	TCCACCAgAgATTTTTgCTTgA	
Sonda	CCggCggACTAgTAgt	

A reação de amplificação foi realizada com as seguintes condições:

{	1 ciclo	50°C a 2 minutos para ativação da UNG 95°C a 10 minutos para desnaturação inicial
	45 ciclos	94°C a 20 segundos para desnaturação 60°C a 1 minuto para hibridação/extensão

A sensibilidade da técnica foi efetuada recorrendo a diluições seriadas de amostras representativas de cada um dos genótipos e cuja carga viral total era conhecida. Como

estas amostras foram identificadas com um único genótipo (detetado neste estudo e confirmado por sequenciação de Sanger), a quantificação obtida segundo a técnica descrita em 2.2.2.1, assumiu-se que correspondia à carga do genótipo identificado.

A especificidade dos *primers* e sonda para o genótipo gB1 foi avaliada utilizando *primers* e sondas específicos para o gB2, gB3 e gB4 (detetado neste estudo e confirmado por sequenciação de Sanger). A do gB2 com *primers* e sondas específicos para o gB1, gB3 e gB4 e assim sucessivamente.

2.2.2.3 Critérios de avaliação dos resultados de PCR em tempo real

Foram considerados os seguintes critérios para a validação dos resultados de PCRtr;

- A diferença entre duplicados não diferir mais de 2 Ct;
- As reações com amplificação cujo $15 \leq C_T \leq 45$ são positivas;
- As reações sem amplificação são negativas [168].

2.2.3 Confirmação dos resultados de PCR em tempo real

2.2.3.1 Sequenciação (Método de Sanger)

Esta metodologia foi utilizada para confirmar os genótipos gB1, gB2, gB3 e gB4.

- *Nested* PCR

O fragmento de DNA (532pb) enviado para sequenciação foi obtido por *Nested* PCR utilizando *primers* específicos para o gene UL55 (Tabela 4).

Tabela 4 – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação de um fragmento (532pb) do gene UL55 [169].

Descrição	Sequência
UL55_Outer_Forward (OF)	5'-TCCgAAgCCgAAgACTCgTA-3'
UL55_Outer_Reverse (OR)	5'-CTTCCTCAgTgCggTggTT-3'
UL55_Inner_Forward (IF)	5'-CTgCCAAAATgACTgCAACT-3'
UL55_Inner_Reverse (IR)	5'-ACATCACCCATgAAACgCgC-3'

As reações de PCR foram realizadas num termociclador Biometra T-Gradient. A primeira amplificação foi efetuada num volume total de 25µl contendo 5µl de suspensão de DNA, *primers* OR e OF [10 µM], dNTPs [0,2mM], MgCl₂ [1,5mM], Tampão Taq polimerase [1X] (200mM Tris-HCl, 500mM KCl) e Taq polimerase [5U/µl] (todos os reagentes e *primers* foram fornecidos pela Invitrogen).

A mistura foi submetida a 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto e 5 segundos a 72°C e 7 minutos a 72°C.

A segunda amplificação foi efetuada num volume total de 25µl contendo 2µl do amplificado obtido na primeira reação, *primers* IR e IF [10 µM], dNTPs [0,2mM], MgCl₂ [1.5mM], Tampão Taq polimerase [1X] (200mM Tris-HCl, 500mM KCl) e Taq polimerase [5U/µl] (todos os reagentes e *primers* foram fornecidos pela Invitrogen).

A mistura foi submetida a 20 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C e 7 minutos a 72°C.

O tamanho e integridade dos amplificados resultantes das reações de *Nested* PCR acima descritas foram verificados por electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X contendo 2µl de brometo de etídio [10mg/mL] (BioRad). O marcador de massa molecular utilizado foi 100pb (Invitrogen).

As bandas foram visualizadas num transiluminador UV acoplado a um sistema de captação de imagens da KODAK após uma corrida em gel de 40 minutos a 140V.

- Purificação dos amplificados

Antes de enviar para a sequenciação o amplificado foi purificado utilizando o *kit* comercial ZymoResearch® (Epigenetics Company) de acordo com o protocolo do fabricante:

- Num tubo de 1,5mL adicionar 5x mais volume de *DNA Binding Buffer* em relação à amostra de DNA. Agitar no vortex;
- Transferir a mistura obtida no passo anterior para uma coluna Zymo-Spin™ ;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente;
- Descartar o filtrado;
- Adicionar 150µl de tampão de lavagem;

- Centrifugar a 10 000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente;
- Repetir os dois últimos passos;
- Adicionar 30µl de tampão de eluição;
- Transferir para um tubo de 1,5mL;
- Centrifugar a 10 000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente para eluir o DNA.

A sequenciação foi efectuada na STAB VIDA e a análise das sequências nucleotídicas foi efectuada recorrendo ao CLUSTALW para o alinhamento destas (atual CLUSTALOMEGA). Para esta análise foram utilizadas as sequências do gene UL55 (depositadas no BLAST) com os números de acesso gB1: (M60929; AY446894.2; FJ616285.1), gB2: (M60931; X04606; X17403.1), gB3: (M85228; GU937742.1), gB4: (M60926).

2.2.3.2 Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP)

Esta metodologia foi utilizada para confirmar o genótipo gB4.

O produto utilizado para digestão foi obtido de acordo com a técnica de *Nested* PCR descrita em 2.2.3 e visualizada a banda correspondente, através de uma electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X.

A digestão por enzimas de restrição foi efectuada recorrendo a duas enzimas, *RsaI* [10U] e *HinfI* [10U]. As reacções foram realizadas em separado num volume total de 50µl contendo 1µg de DNA, 10x *CutSmart Buffer* [1X] e a enzima de restrição [1U]. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora.

2.2.3.3 Next-Generation Sequencing (NGS)

Esta metodologia foi utilizada para confirmar a presença de infeções com > 1 genótipo. Para a realização da técnica de NGS (*Ion Torrent*) é necessário uma concentração mínima de DNA >50ng/µl.

O produto enviado para sequenciação foi obtido de acordo com a técnica de *Nested* PCR descrita em 2.2.3 (fragmento de 532pb). A quantidade de suspensão de DNA utilizado variou entre 5-15µl.

O produto amplificado foi visualizado através de uma electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X durante 40 minutos a 140V e a quantificação foi efetuada por espectrofotometria a 260nm.

A concentração de DNA foi calculada utilizando a formula:

$$\text{Concentração de DNA (ng/ } \mu\text{l)} = \frac{\text{D.O. 260} \times 50 \times V_T}{V(\text{DNA})}$$

D.O. 260 = Densidade ótica a 260nm

V_T = Volume total

V(DNA) = volume do amplificado

A técnica de NGS foi realizada na STAB VIDA recorrendo à tecnologia *Ion Torrent*, (Sequenciador *IonTorrent Personal Genome Machine* - PGM™). Foi utilizado o *Ion 314 sequencing chip*, que possui 1,2 milhões de poços e produz 10Mb (mega pares de bases) de informação, com leituras na ordem das 200 a 300 bases (Figura 2).

Na análise de bioinformática, todas as sequências foram submetidas a um *trimming*. Neste passo as sequências com baixa qualidade são removidas, uma vez que podem dificultar um correto mapeamento. De seguida, as sequências de alta qualidade (*reads*) de 9 amostras foram mapeadas de forma independente contra cada uma das referências (as mesmas que foram utilizadas em 2.2.3.1). Para cada amostra, foram geradas uma lista de sequências de DNA, correspondendo aos *contigs* gerados (formato fasta) e um arquivo de mapeamento (formato bam). Os *contigs* gerados foram então alinhados no BLAST contra uma base de dados *in-house* contendo as mais importantes referências de genomas, com as respectivas pontuações de cada blast a serem calculadas (*blast score*).



Figura 2 – Sequenciador PGM™ (Life Technologies)

3. Resultados

3.1 PCR em tempo real

3.1.1 Genotipagem

- **Especificidade:** A amostra representativa do gB1 (detetado neste estudo e confirmado por sequenciação de Sanger) não teve amplificação com os *primers* e sonda específicos para os genótipos gB2, gB3 e gB4. A do gB2 não teve amplificação com os *primers* e sonda específicos para os genótipos gB1, gB3 e gB4 e assim sucessivamente.
- **Sensibilidade analítica:** Para o gB1, a partir de uma carga viral inicial de $4,78 \times 10^9$ cópias/mL foi possível a detecção até à diluição 10^{-6} com uma carga correspondente de $4,78 \times 10^3$ cópias/mL Para o gB2, a partir de uma carga viral inicial de $2,02 \times 10^6$ foi possível a detecção até à diluição 10^{-5} ($2,02 \times 10^1$). Para o gB3, a partir de uma carga viral inicial de $8,33 \times 10^7$ foi possível a detecção até à diluição 10^{-5} ($8,33 \times 10^2$). Por último, para o gB4, a partir de uma carga viral inicial de $1,43 \times 10^6$ foi possível a detecção até à diluição 10^{-4} ($1,43 \times 10^2$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de sensibilidade obtidos na técnica de genotipagem por PCRtr, para os genótipos gB1, gB2, gB3 e gB4.

Genótipos	Diluição	Resultado (Ct)	Carga Viral (cópias/mL)
gB1	s/ Diluição	Positivo (16,97)	$4,78 \times 10^9$
	(...)	(...)	(...)
	10^{-4}	Positivo (29,27)	$4,78 \times 10^5$
	10^{-5}	Positivo (33,32)	$4,78 \times 10^4$
	10^{-6}	Positivo (36,44)	$4,78 \times 10^3$
	10^{-7}	Negativo	
gB2	s/Diluição	Positivo (30,27)	$2,02 \times 10^6$
	10^{-1}	Positivo (33,26)	$2,02 \times 10^5$
	10^{-2}	Positivo (36,99)	$2,02 \times 10^4$
	10^{-3}	Positivo (38,48)	$2,02 \times 10^3$
	10^{-4}	Positivo (41,00)	$2,02 \times 10^2$
	10^{-5}	Positivo (43,13)	$2,02 \times 10^1$
	10^{-6}	Negativo	
gB3	s/ Diluição	Positivo (19,59)	$8,33 \times 10^7$
	10^{-1}	Positivo (23,04)	$8,33 \times 10^6$
	10^{-2}	Positivo (26,66)	$8,33 \times 10^5$
	10^{-3}	Positivo (29,91)	$8,33 \times 10^4$
	10^{-4}	Positivo (33,23)	$8,33 \times 10^3$
	10^{-5}	Positivo (37,35)	$8,33 \times 10^2$
	10^{-6}	Negativo	
gB4	s/Diluição	Positivo (24,57)	$1,43 \times 10^6$
	10^{-1}	Positivo (28,51)	$1,43 \times 10^5$
	10^{-2}	Positivo (31,45)	$1,43 \times 10^4$
	10^{-3}	Positivo (35,99)	$1,43 \times 10^3$
	10^{-4}	Positivo (39,06)	$1,43 \times 10^2$
	10^{-5}	Negativo	

Das 35 amostras de urina genotipadas através da PCRtr, 29 delas apresentam apenas um único genótipo, tendo sido detetado o gB1 em 13, seguido do gB2 (7/36) e gB4 (6/36). Por outro lado, o gB3 foi detetado em apenas 3 amostras.

Das 6 amostras em foi detetado mais do que um genótipo, em 4 delas foram detetados os genótipos gB2 e gB3, numa o gB1 e o gB3 e ainda outra com os genótipos gB2 e gB4. Apenas numa amostra de urina não foi obtida amplificação para nenhum dos 4 genótipos em estudo (Figura 1). Naquelas em que se detetou a existência de mais do que um genótipo ou que não existiu amplificação, foram efetuadas segundas PCRtr, onde foram confirmados os primeiros resultados.

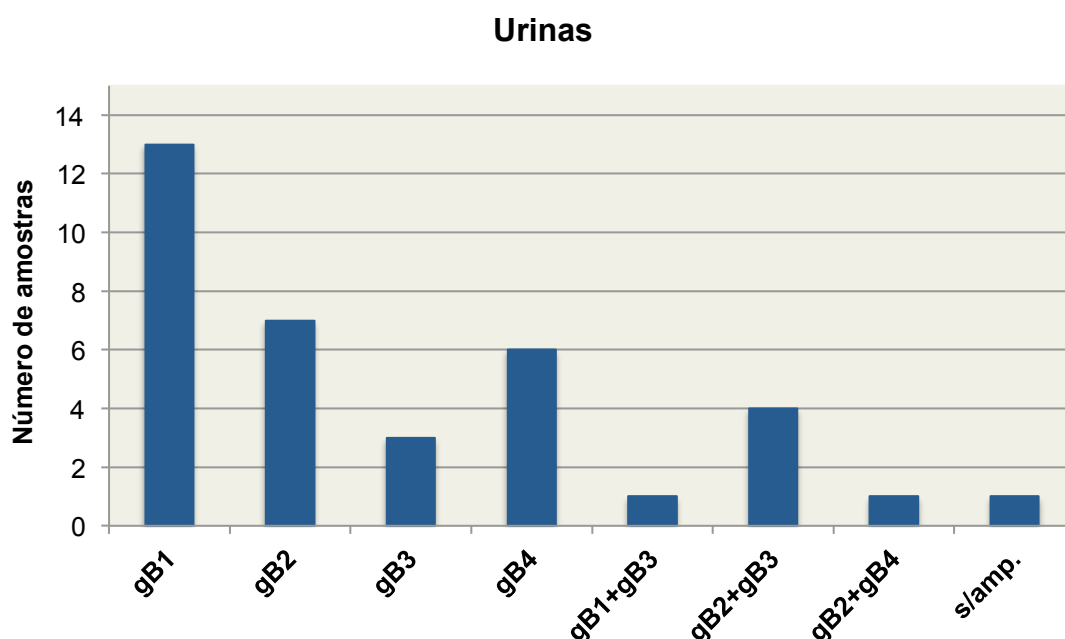


Figura 1 – Distribuição genotípica em amostras de urina (n=35). Sem amplificação (n=1).

Os diferentes genótipos foram associados com o tipo de infecção por CMV, sendo que do total das 36 amostras, 30 eram provenientes de casos de infecção congénita, 2 de casos de infecção perinatal e em 4 desconhecia-se o tipo de infecção. Na infecção congénita, o gB1 foi novamente o mais detectado (9/30), seguido do gB2 e gB4 (6/30). As amostras de urina onde foram encontrados mais do que um genótipo eram provenientes de casos de infecção congénita, ao passo que na infecção perinatal não foram identificadas infecções mistas, o mesmo se sucedendo na infecção desconhecida (Tabela 2).

Destaque ainda, para um caso de infecção congénita em gémeos falsos (U92 e U93) em que foi detetado o mesmo genótipo para ambos (gB1).

Tabela 2 – Distribuição genotípica em amostras de urina associada ao tipo de infecção a CMV (n=36).

	Infecção congénita	Desconhecida	Perinatal
gB1	9	3	1
gB2	6	1	0
gB3	2	0	1
gB4	6	0	0
gB1+gB3	1	0	0
gB2+gB3	4	0	0
gB2+gB4	1	0	0
s/amp.	1	0	0
Total	30	4	2

Os diferentes genótipos foram também associados com o grau de severidade nos recém-nascidos com infecção congénita, nas amostras onde essa informação estava disponível. Três amostras de urina eram provenientes de recém-nascidos com infecção congénita sintomática. Na U23, em foi detetado o gB4, o recém-nascido sofria de ventriculomegalia. Na U83, em que foi detetado o gB3, estava diagnosticada surdez bilateral profunda, sendo que o recém-nascido apresentava icterícia e, por último, a U111 provinha de um recém-nascido que apresentava hemiparesia esquerda espástica tendo sido detetado o gB2. Oito amostras de urina eram provenientes de recém nascidos com infecção congénita assintomática. Destas, em 6 foi detetado um único genótipo, sendo que em 4 delas o gB2 estava presente. Noutras 2 amostras foi detetado mais do que um genótipo (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição genotípica em amostras de urina provenientes de recém-nascidos com infecção congénita assintomática (n=8).

Urinas	Genótipos
U21	gB1+gB3
U29	gB1
U58	gB2
U76	gB4
U123	gB2
U232	gB2
U264	gB2+gB4
U313	gB2

Das amostras de *follow up* genotipadas, apenas na U232 e U264 foi detetada uma variação de genótipo em relação à amostra inicial. Nas restantes, os genótipos identificados nas amostras dos *follow up* são idênticos aos identificados na amostra inicial. Na urina U111, a partir da segunda amostra de *follow up* (colhido às 3 semanas de vida do recém-nascido) foi detetado um genótipo adicional (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição genotípica nas amostras de urina de *follow up* (n=9).

Urinas	Amostra Inicial	Data da colheita das amostras de urina			
		Até ao 1º mês	Do 1º ao 6º mês	Do 6º ao 12º mês	Do 12º ao 18º mês
U23	gB4			gB4	
U49	gB4		gB4		
U58	gB2			gB2	
U83	gB3	gB3			
U111	gB2	gB2 ^a gB2+gB3 ^b	gB2+gB3		
U232	gB2			gB1	gB2+gB3
U257	gB2+gB3				gB2
U264	gB2+gB4	gB3			
U374	gB3	gB3			

^a Amostra de urina colhida ao 3º dia de vida ^b Amostra de urina colhida ao 30º dia.

Das 19 amostras de LA genotipadas, em 5 foi detetado o gB1, o mesmo sucedendo com os gB2 e gB3, seguido do gB4 (2/18). Numa outra amostra não foi obtida amplificação para nenhum dos 4 genótipos. Para além disto, foi detetado mais do que um genótipo em 2 amostras, uma com os genótipos gB1 e gB2 e noutra os gB1, gB2 e gB3 (Figura 2). Nestas foram efetuadas segundas PCRtr, onde foram confirmados os primeiros resultados.

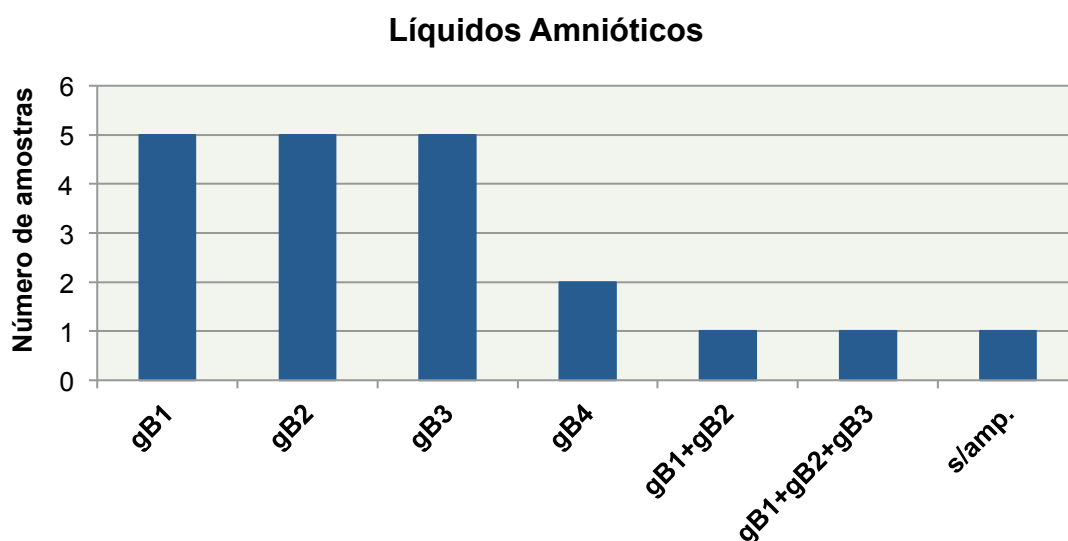


Figura 2 – Distribuição genotípica em amostras de LA (n=19). Sem amplificação (n=1).

3.1.2 Quantificação da carga viral total

No total, foram quantificadas 37 amostras de urina, incluindo as de *follow up* (para o gene UL83). Estas foram agrupadas consoante o número de genótipos que foi possível detetar. Nas 30 em que foi detetado apenas um genótipo foi obtida uma média de $4,98 \times 10^8$ cópias/mL. Naquelas onde foi possível identificar mais do que um genótipo foi obtida uma média de $3,32 \times 10^7$.

Das amostras de *follow up*, 3 revelaram uma carga viral total mais baixa em comparação com a amostra inicial. Em outras 3 existiu um aumento da carga e nas restantes não existem dados disponíveis para estabelecer comparações (Tabela 5).

Tabela 5 – Carga viral total das amostras de *follow up* (n=9).

Urinas	Amostra Inicial	Data da colheita das amostras de urina			
		Até ao 1º mês	Do 1º ao 6º mês	Do 6º ao 12º mês	Do 12º ao 18º mês
U23	s/quant.			3,29x10 ⁶	
U49	s/quant.		1,53x10 ⁶		
U58	2,02x10 ⁶			4,69x10 ⁷	
U83	5,96x10 ⁹	8,33x10 ⁷			
U111	2,70x10 ⁸	1,23x10 ⁸ 3,46x10 ³	8,04x10 ⁶		
U232	3,21x10 ⁷			7,30x10 ⁷	
U257	4,79x10 ⁷				4,34x10 ⁵
U264	s/quant.	2,44x10 ⁶			
U374	3,19x10 ⁶	2,21x10 ⁷			

3.2 Confirmação dos resultados de PCR em tempo real

3.2.1 Sequenciação (Método de Sanger)

Com o objetivo de enviar para sequenciação (método de Sanger), foi realizado um passo de amplificação por *Nested* PCR, para o gene UL55, sendo o fragmento resultante de 532pb (Figura 3).

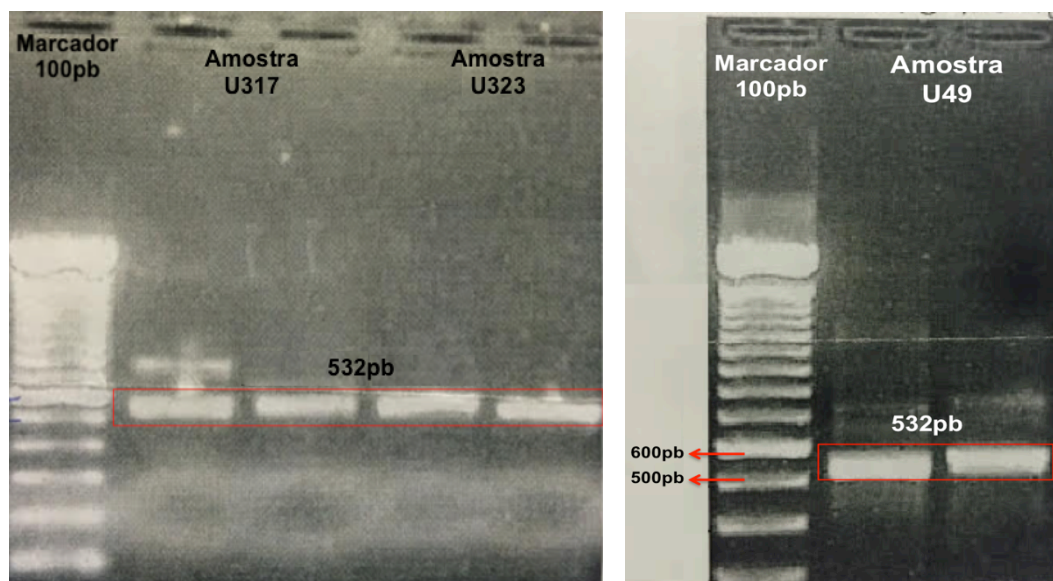


Figura 3 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Amostras U317, U323 e U49).

Das 13 amostras inicialmente propostas para sequenciação, em 3 delas não foi obtida amplificação, mesmo depois de repetido o passo de *Nested* PCR. Das restantes, após o alinhamento (CLUSTALOMEGA) com as sequências nucleotídicas de referência para cada genótipo, foram detetadas 5 discrepâncias em relação à genotipagem por PCRtr. Das amostras gB4 sequenciadas, apenas numa amostra foi confirmado o mesmo genótipo. As U49 e U52, através da sequenciação, revelaram maior similaridade com o gB1 e gB2 respetivamente.

Por outro lado, para os gB1, gB2 e gB3 testados, os resultados de genotipagem foram iguais em ambas as técnicas.

Não foi confirmada a presença de mais do que um genótipo em nenhuma das 3 amostras sequenciadas, ao invés da técnica de PCRtr (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos por PCR em tempo real e por Sequenciação (método de Sanger) (n=13).

Urinas	PCR em tempo real	Sequenciação (M. Sanger)
U21	gB1+gB3	gB1
U29	gB1	gB1
U49	gB4	gB1
U52	gB4	gB2
U58	gB2	gB2
U70	gB4	sem amplificação
U76	gB4	sem amplificação
U91	gB3	gB3
U123	gB2+gB3	gB2
U125	gB2+gB3	gB3
U157	gB4	gB4
U257	gB2+gB3	sem amplificação
U317	gB1	gB1

3.2.2 Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP)

Dada a discordância de resultados entre a PCRtr e a sequenciação (método de Sanger), no que diz respeito ao gB4, foi aplicada a técnica de RFLP nas 6 amostras de urina onde havia sido detetado o genótipo gB4.

Anteriormente à utilização das enzimas nas amostras, foi realizado um passo de amplificação por *Nested* PCR, para o gene UL55, sendo o fragmento resultante de 532pb. A aplicação quer da RsaI, quer da HinfI, pela análise teórica das sequências de

reconhecimento de cada uma das enzimas, originaria duas bandas com pouco mais de 200pb (Figura 4).

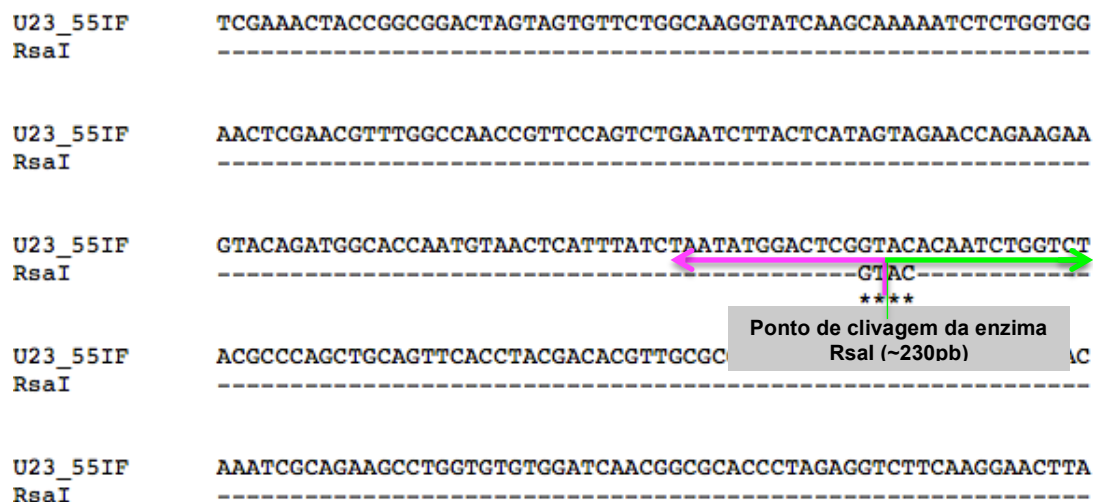


Figura 4 – Representação do ponto de clivagem da enzima RsaI, no fragmento de 532pb amplificado a partir de uma amostra gB4.

No entanto, após RFLP, não foi possível detetar, a partir dos produtos amplificados de 6 amostras, quaisquer diferenças em relação ao fragmento inicial (532pb).

3.2.3 Next-Generation Sequencing (NGS)

Com o objetivo de confirmar a presença de infecções mistas, previamente detetadas por PCRtr, foram sequenciadas 6 amostras de urina e 1 amostra de LA pela técnica de *IonTorrent* (NGS). Previamente foi realizado um passo de amplificação por *Nested* PCR, para o gene UL55 (532pb). Em 4 amostras foi visível o amplificado de interesse, no entanto, para outras 3 não foi possível obter amplificação com 5µl de suspensão de DNA incluído na reação de PCR (Figura 5).

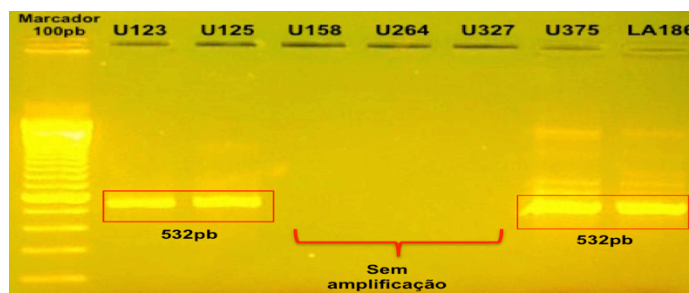


Figura 5 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (n=8).

Para as 3 amostras em que não foi obtido produto amplificado, foi realizada uma segunda *nested* PCR com 10µl de suspensão de DNA incluído na reação de PCR. Foi obtida amplificação apenas, para uma das amostras, sendo que nas outras 2 persistiu o mesmo problema. Nestas realizou-se uma terceira sessão onde foram utilizados 15µl de suspensão de DNA na reação de PCR, tendo sido obtida amplificação (Figura 6).

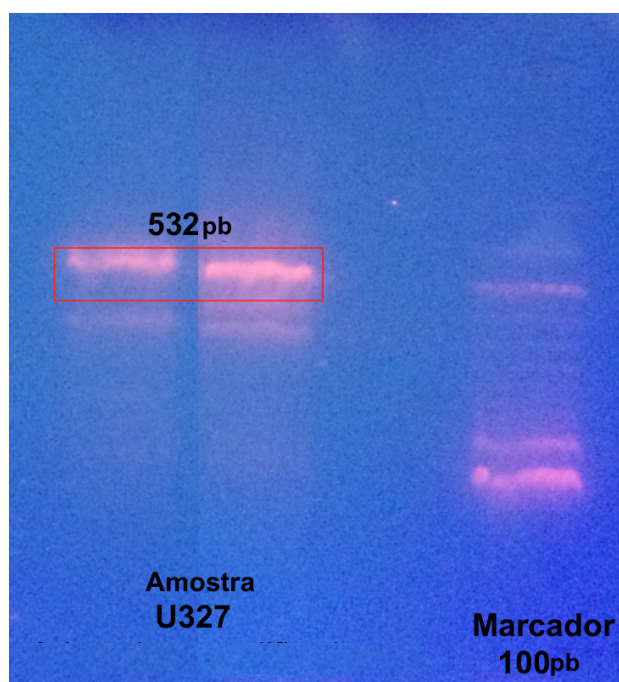


Figura 6 – Fragmentos de DNA obtidos através de reações de PCR após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Amostra U327).

Após a sequenciação pela técnica de *Ion Torrent*, a amostra U377 com um único genótipo foi confirmada (gB3). Nas restantes amostras, em que foi detetado mais do que um genótipo por PCRtr, até ao momento a análise efetuada confirma a presença de um dos genótipos. No entanto, como a análise ainda não está concluída, os resultados são considerados preliminares (Tabela 7) (Anexo 2).

Tabela 7 – Comparação dos resultados obtidos por PCR em tempo real e por NGS (análise preliminar) (n=7)

Urinas	PCR em tempo real (PCRtr)	Sequenciação por <i>Ion Torrent</i>
U123	gB2+gB3	gB2
U125	gB2+gB3	gB3
U158	gB2+gB3	gB2
U327	gB2+gB4	gB2
U375	gB2+gB3	gB2
U377	gB3	gB3
LA186	gB1+gB2	gB1

A primeira fase passará pela análise das bases nucleotídicas características de cada um dos genótipos em estudo, em cada uma das amostras sequenciadas (Figura 7). Numa segunda fase, realizar-se-á um novo alinhamento com as sequências de referência que foram utilizadas em 2.2.3.1, de modo a compreender se as diferenças encontradas correspondem às bases nucleotídicas características de cada um dos genótipos, e/ou se existe mais do que um nucleótido atribuído para uma mesma posição nucleotídica, podendo este facto estar associado a infeções mistas.

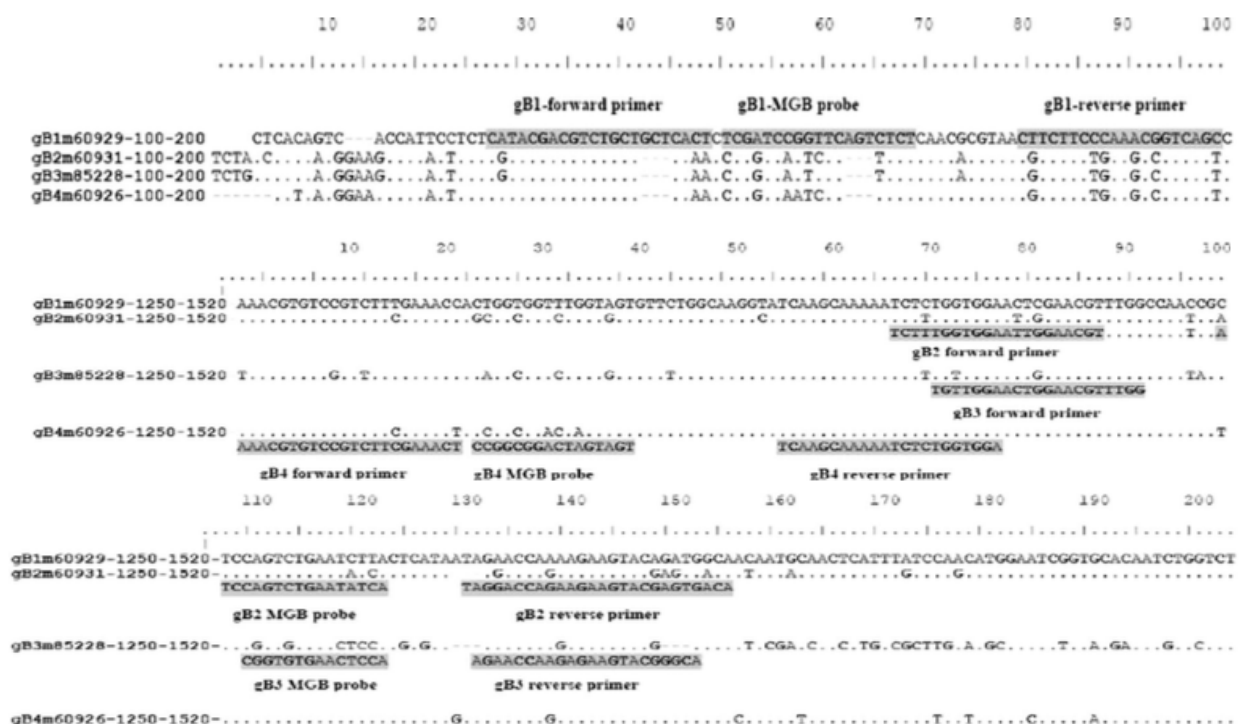


Figura 7 – Alinhamento múltiplo dos 4 tipos de gB. Os locais do genoma a sombreado representam o local de hibridação dos primers e sondas utilizados neste estudo. Os pontos representam as sequências consenso [167].

4. Discussão e Conclusões

O objetivo do presente estudo foi compreender a distribuição de genótipos de CMV em recém-nascidos com infecção congénita, recorrendo ao gene UL55, que codifica para a gB podendo esta assumir, pelo menos, 4 genótipos distintos. Este gene demonstrou ser um bom alvo para a genotipagem, devido à sua significativa variação genética [150].

A aplicação da técnica de PCRtr neste estudo de genotipagem, sugere o genótipo gB1 como o mais frequente em amostras de urina provenientes de recém-nascidos com infecção congénita, estando este resultado em consonância com outros estudos publicados nos Estados Unidos da América [170], na Austrália [66], na Hungria [171], em Itália [172, 173], no Brasil [145], no Japão [125] ou na Holanda [169]. No entanto, outros autores apontam para outros genótipos, como os mais frequentes [174-176].

Para além do gB1 assumem também alguma importância no contexto da infecção congénita o gB2 e gB3, como é indicado na generalidade dos estudos publicados, na Europa [170-173], ou na China [135]. Estes dados foram corroborados pelo nosso estudo no que diz respeito ao gB2, mas o gB3 foi encontrado numa frequência mais baixa em comparação com os mesmos estudos.

O gB4 foi detetado em maior número no nosso estudo em comparação com outras publicações [170, 177]. No entanto, outros autores reportam dados semelhantes, nomeadamente na Europa [172, 173], assumindo que podem existir discrepâncias na distribuição geográfica, quer para o gB4 quer para outros tipos de gB [172]. Apesar disso, não foi possível confirmar, quer por sequenciação (método de Sanger) quer por RFLP a presença deste genótipo na maioria das amostras. Na sequenciação, o facto de apenas uma amostra ter sido confirmada como gB4 num total de seis, leva a crer que existam mutações no local de ligação dos *primers* para o gB4. A corroborar esta última hipótese, está o facto de duas urinas gB4 não terem sido amplificadas por *Nested* PCR, mesmo quando testadas mais do que uma vez. Importa destacar que para todos os outros genótipos foram confirmados os resultados de PCRtr. No que diz respeito à técnica de RFLP, não foi devidamente otimizada no nosso estudo, não tendo sido uma mais valia, embora outros estudos recorrendo à mesma metodologia tenham obtido resultados satisfatórios [135, 174].

Nas amostras de LA foi demonstrada a predominância do gB1, gB2 e gB3, ao contrário do gB4 que parece ser menos frequente. Esta distribuição de genótipos é muito

semelhante à observada por Picone e colaboradores, utilizando a técnica de PCRtr no mesmo tipo de amostra [178]. Contudo, ao contrário dos resultados do nosso estudo, não foi até agora documentada a presença de mais do que um genótipo em amostras de LA. Hipoteticamente, numa das duas amostras do nosso estudo, onde foi detetado simultaneamente o gB1, gB2 e gB3, pode ter ocorrido uma contaminação, com um outro material biológico ou na altura da extração de DNA. Na amostra de LA onde foram detetados os genótipos gB1 e gB2, apenas foi possível confirmar por NGS a presença do gB1.

Foi também possível perceber que todos os genótipos da gB estão envolvidos na infeção congénita, confirmando a hipótese de todos estes poderem ser transmitidos verticalmente da mãe para o feto, tal como outros autores reportaram [169, 178, 179]. Contudo, tem sido colocada a hipótese de que as estirpes gB1 possam ter um maior tropismo para os tecidos placentários e uma transmissão preferencial para o feto. Hipótese não confirmada, no entanto, por Trincado e colaboradores que descreveram o gB2 como predominante em tecidos placentários [66].

Neste estudo destacam-se duas amostras (U92 e U93) provenientes de gémeos falsos, em que o gB1 foi capaz de infetar ambos os fetos.

Por outro lado, o gB1 parece ser o genótipo em maior circulação entre a espécie humana, pois para além do contexto da infeção congénita, estudos demonstram a relevância deste genótipo noutros contextos, como em imunocomprometidos [167, 180]. Do total de 56 amostras genotipadas, apenas em duas (uma urina e um LA) não foi obtida amplificação. Dada a impossibilidade de quantificação da carga viral destas duas amostras, não foi possível determinar se estas continham carga viral suficiente (acima do limiar de sensibilidade). Existe também a hipótese de haver mutações no local de ligação dos *primers* e/ou sonda específicos (Nye e col., 2005), ou a possibilidade de as amostras serem amplificadas por *primers* e sondas específicas para um outro genótipo não incluído no estudo [143] ou que não seja conhecido.

Do total de amostras genotipadas, 2 são referentes a infeção perinatal e 4 a infeção desconhecida (congénita/perinatal). Dado o seu número reduzido não foi possível estabelecer qualquer tipo de associação, permanecendo a hipótese de que a frequência de tipos de gB seja similar em comparação com a infeção congénita.

Segundo o nosso estudo, também a infecção com mais do que um genótipo parece estar associado a infecção congênita, apesar de ter sido detetado em número reduzido. Populações mistas de CMV têm sido documentadas em fetos e recém-nascidos na infecção congênita, bem como em mulheres grávidas [177, 179, 182, 183]. Estudos em hospedeiros imunocompetentes e imunodeprimidos, demonstram que diferentes genótipos de CMV têm sido detetados desde crianças a adultos. Embora reportem que estes genótipos sejam adquiridos ao longo do tempo através de reinfecções [71, 73, 184], também é possível que vários genótipos possam ser adquiridos no momento da infecção primária por CMV, sendo que a transmissão vertical para o feto ocorre após a virémia materna.

Se esta transmissão ocorre como um único evento durante a gravidez ou por meio de vários eventos de transmissão no decurso desta é ainda desconhecido. Investigadores baseando-se em modelos animais têm mostrado que a virémia materna leva a uma infecção placentária, e, em alguns casos, uma virémia secundária pode ocorrer e resultar numa infecção secundária da placenta. A difusão para o feto nem sempre é imediata e a placenta serve como um reservatório para o vírus [185].

Contudo, através de técnicas de NGS, não tem sido possível confirmar a existência de populações mistas de CMV [186]. O mesmo está descrito para indivíduos imunocompetentes, excetuando nos casos de reinfecção [68]. O nosso estudo parece corroborar esta hipótese, pois recorrendo à técnica de *Ion Torrent* não foi, até à presente data, possível confirmar a presença de mais do que um genótipo em nenhuma das amostras testadas. No entanto, os resultados são ainda preliminares, uma vez que ainda é necessário realizar uma melhor análise das bases nucleotídicas características de cada um dos 4 genótipos em estudo, de modo a concluir se existe mais do que um genótipo nas amostras enviadas para sequenciação por NGS.

A análise dos resultados da NGS (fase preliminar) confirma os resultados obtidos na sequenciação (método de Sanger). Em ambas as técnicas, pelo menos um dos genótipos foi identificado nas amostras com populações mistas. Em 7 destas amostras o genótipo identificado coincidiu com um valor mais baixo de Ct (isto é, com maior carga viral) segundo a técnica de PCRtr. É de notar, porém, que o procedimento de genotipagem baseado em sequenciação tem a limitação de, apenas detetar o genótipo *major* em

amostras contendo populações mistas. Os genótipos *minor*, no entanto, são detetáveis se a sua contribuição for, de pelo menos, 25% da população viral total [169].

Na maioria das amostras de *follow up* genotipadas, o genótipo detetado coincidiu com o da amostra inicial, corroborando os estudos longitudinais realizados, sugerindo que as populações de CMV são geralmente estáveis ao longo do tempo. Atualmente, a grande maioria destes estudos têm-se focado em transplantados. Nestes indivíduos imunodeprimidos, a genotipagem através de PCRtr e sequenciação mostraram a existência de populações mistas, mas a composição destas permanece aproximadamente constante na maior parte dos indivíduos, ao longo do tempo [128, 154]. Um outro estudo longitudinal no contexto da infeção congénita mostrou resultados semelhantes [75]. O padrão predominante deste estudo demonstra que, de uma forma geral, as populações de CMV contêm uma sequência dominante (representa ~90% da população viral total), enquanto que a população restante é ocupada por um conjunto diverso de sequências, em grande parte, estáveis.

No nosso estudo, 2 amostras de *follow up* (U232 e U264) não corroboraram a hipótese de estabilidade do CMV ao longo do tempo. Verificou-se uma alteração no *follow up* das amostras U232 e U264, colhidas respectivamente aos 9 e 1 mês de vida. Tendo em conta o curto período de tempo decorrido, uma das possíveis explicações para estas alterações poderá ser uma identificação errada das amostras *follow up*.

No *follow up* da amostra U111, colhido aos 30 dias de vida do recém-nascido foi detetado um genótipo adicional (gB3) em comparação à amostra inicial (gB2), para este podemos encontrar duas justificações. Tratar-se de um caso de reinfeção ou o genótipo gB3 estar presente na amostra inicial, mas estar abaixo do limiar de sensibilidade da PCRtr utilizada, isto é, não ter sido detetável.

Das amostras nas quais foi realizada quantificação, não foi possível verificar se existe associação entre a carga viral total (determinada para o gene UL83) e a presença de um ou mais do que um genótipo (determinado pelo gene UL55) sendo, no entanto, expectável que a média das cargas virais não apresentem diferenças significativas. A grande maioria dos estudos publicados, prova que não existem diferenças significativas no que toca às cargas virais dos diferentes genótipos nem diferenças a nível de infeções com um ou mais do que um genótipo [169, 179]. As diferenças das cargas virais

parecem ser mais significativas quando associadas ao tipo de infecção. Um estudo publicado recentemente demonstra que as crianças com infecção pós-natal têm significativamente menor carga viral detetada na urina do que os recém-nascidos com infecção congénita por CMV [187].

Das amostras de *follow up* quantificadas foi possível detetar elevadas cargas virais. De notar, que todas as amostras foram provenientes de recém-nascidos com infecção congénita. No entanto, e em comparação com a amostra inicial, foi possível assistir a decréscimo da carga viral. Na U111, onde foi preconizado ganciclovir nas primeiras 6 semanas, foi confirmado um decréscimo mais acentuado da carga viral, o mesmo não se verificando na U374 (valganciclovir até aos 6 meses). Em outras 3 amostras não foi possível estabelecer comparações pois não existiu amostra suficiente para proceder à quantificação da amostra inicial, limitando os resultados do nosso estudo.

No que toca ao impacto que os diferentes tipos de gB podem ter no grau de severidade da infecção congénita não foi possível estabelecer qualquer associação dada a reduzida informação acerca da proveniência das amostras.

A maioria dos estudos que procuram estabelecer este tipo de associações obtêm resultados inconclusivos ou mesmo contraditórios, sendo que a maioria não revela nenhuma relação entre qualquer genótipo e o resultado numa infecção congénita a CMV [66, 170] o mesmo acontecendo em estudos que associam infecções mistas com maior risco de sequelas típicas deste tipo de infecção [179]. No entanto, a título de exemplo, outros estudos demonstram o gB3 como sendo mais frequente em casos congénitos com perda auditiva neurosensorial [125]. Para além disso, o gB1 foi associado a doença hepática relacionada com CMV [144]. Estas contradições sugerem que outros fatores, incluindo outros genótipos de CMV, mas principalmente o tempo de início da infecção e, portanto, o estágio de maturação cerebral, influenciam o desenvolvimento de doença grave [188].

Em resumo, que seja do nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo de genotipagem no contexto da infecção congénita realizado a nível nacional. Através da PCRtr foi possível demonstrar que todos os genótipos estão envolvidos na infecção congénita existindo, no entanto, uma predominância do gB1, durante o período de tempo estudado

(2009-2016), estando estes dados em consonância com o que está descrito noutros países. Esta informação pode vir a tornar-se relevante e trazer resposta a outras questões, nomeadamente e a título de exemplo, compreender se o grau de severidade na infeção congénita pode estar associado a um genótipo específico.

Neste estudo, as diferentes técnicas de sequenciação utilizadas para confirmar os resultados de PCRtr não foram conclusivas, não permitindo compreender a verdadeira dimensão das infeções mistas (com >1 genótipo), apesar dos resultados serem ainda preliminares no que toca à análise dos dados obtidos por NGS. No que diz respeito às populações mistas, pode ter existido uma subestimativa em relação à ampla dimensão deste tipo de populações pois, duas amostras distintas genotipadas como gB1, podem na realidade pertencer a uma estirpe diferente se o estudo de genotipagem tiver como alvo um gene distinto [132]. Para além disso, estudos demonstram que em diferentes reservatórios do CMV, no mesmo hospedeiro humano, podem ser detetados genótipos diferentes conduzindo a uma população mista de CMV intra-hospedeiro.

Apesar dos resultados obtidos, o nosso estudo teve algumas limitações, nomeadamente a amostra estudada ter sido reduzida, ter sido incluído um grupo de crianças com infeção perinatal e outro com infeção desconhecida (apesar do número insignificante de amostras), podendo estes factos serem considerados como um viés de seleção e conduzirem a uma subestimativa. Não menos importante, foi a diferença de sensibilidade detetada entre os *primers* e sondas específicos para cada genótipo em estudo, ou mesmo o contexto em que os *primers* foram aplicados. A técnica de PCRtr utilizada neste trabalho foi otimizada para amostras de urina, mas anteriormente, os *primers* e sondas haviam sido aplicados num contexto de infeção citomegálica em imunocomprometidos [167].

O nosso estudo pode ter dado um contributo de maneira a entender como variam os genótipos da gB ao longo dos primeiros meses de vida. Apesar do número reduzido de amostras, não parecem existir alterações num período curto de tempo sendo, no entanto, interessante analisar amostras de *follow up* por um período mais alargado.

Este estudo de genotipagem pode servir de base para outros, utilizando como alvo um maior número de genes variáveis ao mesmo tempo, ou analisar no mesmo gene mais do que uma região considerada variável de modo a perceber a verdadeira dimensão da variabilidade do CMV nos seus hospedeiros.

Referências bibliográficas:

- 1- Ho, M.** 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology*. **197**: 65-73.
- 2- Farber, S., Wolbach, S.** 1932. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of children. *American Journal of Pathology* **8**: 123–135.
- 3- Wyatt, J. P., Saxton, J., Lee, R. S., Pinkerton, H.** 1950. Generalized cytomegalic inclusion disease. *Journal of Pediatrics*. **36**: 271–294.
- 4- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C., Huebner, R. J.** 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **92**: 418–424.
- 5- Riley, H. D. Jr.** 1997. History of cytomegalovirus. *Southern Medical Journal*. **90**: 184-190.
- 6- Weller, T. H., Macauley, J. C., Craig, J. M., Wirth, P.** 1957. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **94**: 4–12.
- 7- Weller, T. H.** 1970. Cytomegalovirus: the difficult years. *The Journal of Infectious Diseases* **122**: 532–539.
- 8- Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T., Takai, S., Ishida, N.** 1970. Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant women. *American Journal of Epidemiology*. **91**: 410–417.

- 9- Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M., Alford, C.A. Jr.** 1973. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *The New England Journal of Medicine*. **289**: 1–5.
- 10- Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F., Alford, C. A. Jr.** 1980. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *The New England Journal of Medicine*. **302**: 1073–1074.
- 11- Lamb, S.B., Stern, H.** 1966. Cytomegalovirus mononucleosis with jaundice as presenting sign. *Lancet*. **2**: 1003–1007.
- 12- Chretien, JH, McGinnis, CG, Muller, A.** 1977. Venereal causes of cytomegalovirus mononucleosis. *The Journal of the American Medical Association*. **238**: 1644–1645.
- 13- Ho, M., Suwansirikul, S., Dowling, J. N., Youngblood, L. A., Armstrong, J. A.** 1975. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *The New England Journal of Medicine*. **293**: 1109–1112.
- 14- Diosi, P., Moldovan, E., Tomescu, N.** 1969. Latent cytomegalovirus infection in blood donors. *British Medical Journal*. **4**: 660–662.
- 15- Klemola, E., Kaariainen, L.** 1965. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *British Medical Journal*. **2**: 1099–1102.
- 16- Fowler, K. B., Pass, R. F.** 2006. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics*. **118**: 286-292.
- 17- Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E., Henderson, R. E., Moore, E. G., Walton, P. D., Alford, C. A.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *The New England Journal of Medicine*. **306**: 945-949.

- 18- Boppana, S. B., Fowler, K. B., Britt, W. J., Stagno, S., Pass, R. F.** 1999. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics*. **104**: 55-60.
- 19- Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F.** 2003. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of the American Medical Association*. **289**: 1008-1011.
- 20- Stagno, S., Reynolds, D. W., Tsiantos, A., Fuccillo, D. A., Long, W., Alford, C. A.** 1975. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natively acquired cytomegalovirus infections. *The Journal of Infectious Diseases*. **132**: 568-577.
- 21- Balcarek, K. B., Warren, W., Smith, R. J., Lyon, M. D., Pass, R. F.** 1993. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *The Journal of Infectious Diseases*. **167**: 1433-1436.
- 22- Revello, M. G., Zavattoni, M., Sarasini, A., Percivalle, E., Simoncini, L., Gerna, G.** 1998. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*. **177**: 1170-1175.
- 23- Lazzarotto, T., Guerra, B., Spezzacatena, P., Varani, S., Gabrielli, L., Pradelli, P., Rumpianesi, F., Banzi, C., Bovicelli, L., Landini, M.** 1998. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection, *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 3540-3544.
- 24- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Luraschi, C., Corbetta, C.** 1996. Diagnosis of congenital Cytomegalovirus Infection by detection of viral DNA in dried spots. *Clinical and Diagnostic Virology*. **6**: 27-32.
- 25- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of Virology*. **70**: 78-83.

- 26- Boppana, S. B., Rivera, L. B., Fowler, K. B., Mach, M., Britt, W. J.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England Journal of Medicine*. **344**: 1366-1371.
- 27- McGeoch, D., Rixon, F., Davison, A. J.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*. **117**: 90-104.
- 28- Leung, A., Sauve, R., Davies, H.** 2003. Congenital cytomegalovirus infection. *Journal of the National Medical Association*. **95**: 213-218.
- 29- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*. **98**: 269-297.
- 30- Britt, W., Mach, M.** 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. **39**: 401-412.
- 31- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., Koszinowski, U. H.** 2000. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoproteins genes. *Journal of Virology*. **74**: 7720-7729.
- 32- Gretch, D. R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R. C., Stinski, M. F.** 1988. Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*. **62**: 875-881.
- 33- Theiler, R. N., Compton, T.** 2001. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 39226-39231.
- 34- Gonczol, E., Plotkin, S.** 2001. Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opinion on Biological Therapy*. **1**: 401-412.
- 35- Huber, M. T., Compton, T.** 1998. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *Journal of Virology*. **72**: 8191-8197.

- 36- Kari, B., Li, W., Cooper, J., Goertz, R., Radeke, B.** 1994. The human cytomegalovirus UL100 gene encodes the gC-II glycoproteins recognized by group 2 monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*. **75**: 3081-3086.
- 37- Baldick, C. J., Shenk, T.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *Journal of Virology*. **70**: 6097-6105.
- 38- Lu, M., Shenk, T.** 1999. Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *Journal of Virology*. **73**: 676-683.
- 39- Mocarski, E. S., Courcelle, C. T.** 2001. Cytomegalovirus and their replication. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2629–2673). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- 40- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison III, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M., Barrell, B. G.** 1990. Analysis of the protein-coding content of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **154**: 125-169.
- 41- Karlin, S., Mocarski, E. S., Schachtel, G. A.** 1994. Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *Journal of Virology*. **68**: 1886-1902.
- 42- Novotny, J., Rigoutsos, I., Coleman, D., Shenk, T.** 2001. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *Journal of Molecular Biology*. **310**: 1151-1166.
- 43- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., Liu, F.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**: 14223-14228.

- 44- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H., Jahn, G.** 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology*. **76**: 741-750.
- 45- Mocarski, E. S., Shenk, T., Pass, R. F.** 2006. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM (ed) *Fields virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 2701-2772.
- 46- Kari, B., Gehrz, R.** 1992. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *Journal of Virology*. **66**: 1761–1764.
- 47- Kari, B., Gehrz, R.** 1993. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *Journal of General Virology*. **74**: 255–264.
- 48- Compton, T., Nowlin, D. M., Cooper, N. R.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*. **193**: 834-841.
- 49- Zhu, H., Cong, J. P., Shenk, T.** 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of the interferon-responsive RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**: 13985–13990.
- 50- Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T., Shenk, T.** 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**: 14470-14475.
- 51- Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D., Shenk, T.** 2001. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *Journal of Virology*. **75**: 12319-12330.

- 52- Irmiere, A., Gibson, W.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. **130**: 118-133.
- 53- Revello, M. G., Percivalle, E., Di Matteo, A., Morini, F., Gerna, G.** 1992. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *Journal of General Virology*. **73**: 437-442.
- 54- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B., Jahn, G.** 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *Journal of General Virology*. **81**: 3021-3035.
- 55- Stenberg, R. M.** 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology*. **39**: 343-349.
- 56- Colberg-Poley, A. M.** 1996. Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci. *Intervirology* **39**: 350-360.
- 57- Fortunato, E. A., McElroy, A. K., Sanchez, I., Spector, D. H.** 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends in Microbiology*. **8**: 111-119.
- 58- Castillo, J.P., Kowalik, T. F.** 2002. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene*. **290**: 19-34.
- 59- Goldmacher V. S.** 2004. Cell death suppressors encoded by cytomegalovirus. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. **26**: 1-18.
- 60- Sinclair, J., Sissons, P.** 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*. **87**: 1763-1779.

- 61- Huang, E. S., Huong, S. M., Tegtmeier, G. E., Alford, C.** 1980. Cytomegalovirus: genetic variation of viral genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **354**: 332-346.
- 62- Bradley, A. J., Lurain, N. S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., Baluchova, K., Gatherer, D., Wilkinson, W. G., Dargan, D. J., Davison, A. J.** 2009. High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *Journal of General Virology*. **90**: 2375-2380.
- 63- Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D. J., Thomson, M., Griffiths, P. D., Wilkinson, W. G., Schulz, T. F., Davison, A. J.** 2009. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *Journal of General Virology*. **91**: 605-615.
- 64- Sowmya, P., Madhavan, H. N.** 2009. Analysis of mixed infections by multiple genotypes of human cytomegalovirus in immunocompromised patients. *Journal of Medical Virology*. **81**: 861-869.
- 65- Coaquette, A., Bourgeois, A., Dirand, C., Varin, A., Chen, W., Herbein, G.** 2004. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*. **39**: 155-161.
- 66- Trincado, D. E., Scott, G. M., White, P. A., Hunt, C., Rasmussen, L., Rawlinson, W. D.** 2000. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *Journal of Medical Virology*. **61**: 481-487.
- 67- Ross, S. A., Novak, Z., Pati, S., Patro, R. K., Blumenthal, J., Danthuluri, V. R., Ahmed, A., Michaels, M. G., Sanchéz, P. J., Bernstein, D. I., Tolan, R. W., Palmer, A. L., Britt, W. J., Fowler, K. B., Boppana, S. B.** 2011. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Infectious Diseases*. **204**: 1003-1007.
- 68- Görzer, I., Guelly, C., Trajanoski, S., Puchhammer-Stöckl, E.** 2010. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *Journal of Virology*. **84**: 7195-7203.

- 69- Renzette, N., Gibson, L., Jensen, J. D., Kowalik, T. F.** 2014. Human cytomegalovirus intrahost evolution a new avenue for understanding and controlling herpesvirus infections. *Current Opinion in Virology*. **8**: 109-115.
- 70- Chou, S., Marousek, G. I.** 2008. Accelerated evolution of maribavir resistance in a cytomegalovirus exonuclease domain II mutant. *Journal of Virology*. **82**: 246-253.
- 71- Bale, J. F. Jr., Petheram, S. J., Souza, I. E., Murph, J. R.** 1996. Cytomegalovirus reinfection in young children. *Journal of Pediatrics*. **128**: 347-352.
- 72- Boppana, S.B., Rivera, L. B., Fowler, K. B., Mach, M., Britt, W. J.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England Journal of Medicine*. **344**: 1366-1371.
- 73- Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., Boppana, S. B., Novak, Z., Wagatsuma, V. M., Oliveira, P. F., Duarte, G., Britt, W. J.** 2010. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. **202**: 297.e1-8.
- 74- Ross, S. A., Arora, N., Novak, Z., Fowler, K. B., Britt, W. J., Boppana, S. B.** 2010. Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *The Journal of Infectious Diseases*. **201**: 386-389.
- 75- Renzette, N., Gibson, L., Bhattacharjee, B., Fisher D., Schleiss, M. R., Jensen, J. D., Kowalik, T. F.** 2013. Rapid Intrahost Evolution of Human Cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genetics*. **9**: 1-14.
- 76- Griffiths, P. D.** 2000. Cytomegalovirus. In A. J. Zuckerman, J. E. Banatvala, & J. R. Pattison (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology* (pp. 79–116). London: John Wiley and Sons.
- 77- Pass, R. F.** 2001. Cytomegalovirus. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2675–2705). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

- 78- Dowd, J. B., Aiello, A. E., Alley, D. E.** 2009. Socioeconomic disparities in the seroprevalence of cytomegalovirus infection in the US population: NHANES III. *Epidemiology & Infection.* **137**: 58–65.
- 79- Nassikas, M., Tsaples, G.** 2013. Epidemiology of Cytomegalovirus. Paper for the 31st International Conference of the System Dynamics Society Cambridge, MA—July 21–25.
- 80- Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M.** 2015. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology.* **235**: 288-297.
- 81- Kenneson, A., Cannon, M. J.** 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology.* **17**: 253-276.
- 82- Almeida, S., Gouveia, P., Jorge, A., Mendes, A., Duarte, C., Faria, N., Paixao, P.** 2010. Infecção congénita por Citomegalovirus. Prevalência numa população da Beira Interior. *Acta Pediatrica Portuguesa.* **41**: 162-165.
- 83- Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., Veren, D. A., Page, F., Alford, C. A.** 1986. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *The Journal of the American Medical Association.* **256**: 1904-1908.
- 84- Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B., Gupta R. K.** 2013. The "Silent" Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews.* **26**: 86-102.
- 85- Kim, C. S.** 2010. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Korean Journal of Pediatrics.* **53**: 14-20.

- 86- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R. F., Alford, C. A.** 1983. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* **72**: 295–299.
- 87- Vochem, M., Hamprecht, K., Jahn, G., Speer, C. P.** 1998. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. **17**: 53–58.
- 88- Lopo, S., Vinagre, E., Palminha, P., Paixao, M. T., Nogueira, P., Freitas, M. G.** 2004. Seroprevalence to cytomegalovirus in the portuguese population, 2002-2003. *Eurosurveillance*. **16**: 1-6.
- 89- Paixao, P.** 2009. Contributo para o estudo da infecção congénita pelo vírus citomegálico em Portugal. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.
- 90- Drew, W. L., Ives, D., Lalezari, J. P., Crumpacker, C., Follansbee, S. E., Spector, S. A., Benson, C. A., Friedberg, D. N., Hubbard, L., Stempien, M. J., Shadman, A., Buhles, W.** 1995. Oral ganciclovir as maintenance treatment for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *The New England Journal of Medicine*. **333**: 615–620.
- 91- Rubin, R. H.** 1991. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *The New England Journal of Medicine*. **324**: 1057-1059.
- 92- Malm, G., Engman, M.** 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal & Neonatal medicine*. **12**: 154-159.
- 93- Jahan, M.** 2010. Laboratory Diagnosis of CMV Infection: A Review. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*. **4**: 39-44.

- 94- Chou, S. W., Scott, K. M.** 1988. Rapid quantitation of cytomegalovirus and assay of neutralizing antibody by using monoclonal antibody to the major immediate-early viral protein. *Journal of Clinical Microbiology*. **26**: 504–507.
- 95- Reina, J., Ballia, P., Salva, F., Lopez-Corominas, V., Fernandez-Baca, V., Alberto, C., Saurina, J.** 1997. Utility of different analytical techniques in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **15**: 502–503.
- 96- Pass, R. F., Britt, W. J., Stagno, S.** 1995. Cytomegalovirus. In: Lennette, EH.; Lennette, DA.; Lennette, ET., editors. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. 5th ed.. Washington D.C.: American Public Health Association. p. 253-271.
- 97- Genser, B., Truschnig-Wilders, M., Stunzner, D., Landini, M.P., Halwachs-Baumann, G.** 2001. Evaluation of five commercial enzyme immunoassays for the detection of human cytomegalovirus-specific IgM antibodies in the absence of a commercially available gold standard. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **39**: 62-70.
- 98- Naumnik, B., Malyszko, J., Chyczewski, L., Kovalchuk, O., Mysliwiec, M.** 2007. Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. **39**: 2748-2750.
- 99- Revello, M. G., Gerna, G.** 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**: 680-715.
- 100- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G., Milanesi, G.** 1992. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *The Journal of Infectious Diseases*. **166**: 1236-1244.

- 101- Lo, C. Y., Ho, K. N., Yuen, K. Y., Lui, S. L., Li, F. K., Chan, T. M., Lo, W. K., Cheng I. K.** 1997. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Experimental and Clinical Transplantation*. **11**: 286-293.
- 102- Niubo, J., Perez, J. L., Martinez-Lacasa, J.T., Garcia, A., Roca, J., Fabregat, J., Gil-Vernet, S., Martin, R.** 1996. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagnostic. Microbiology and Infectious Disease*. **24**: 19-24.
- 103- Schafer, P., Tenschert, W., Gutensohn, K., Laufs, R.** 1997. Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 741-744.
- 104- Rasmussen, L., Geissler, A., Cowan, C., Chase, A., Winters, M.** 2002. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *Journal of Virology*. **76**: 10841-10848.
- 105- Kim, D.J., Kim, S.J., Park, J., Choi, G.S., Lee, S., Kwon, C.D., Ki, C., Joh, J.** 2007. Realtime PCR assay compared with antigenemia assay for detecting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. **39**: 1458-1460.
- 106- Mhiri, L., Kaabi, B., Houimel, M., Arrouji, Z., Slim A.** 2007. Comparison of pp65 antigenemia, quantitative PCR and DNA hybrid capture for detection of cytomegalovirus in transplant recipients and AIDS patients. *Journal of Virological Methods*. **143**: 23-28.
- 107- Seehofer, D., Meisel, H., Rayes, N., Stein, A., Langrehr, J. M., Settmacher, U., Neuhaus, P.** 2004. Prospective evaluation of the clinical utility of different methods for the detection of human cytomegalovirus disease after liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. **4**: 1331-1337.

- 108- Carraro, E., Granato, C. F.** 2003. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *Journal of Medical Virology*. **70**: 240-243.
- 109- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Caroppo, S., Dido, P., Guidotti, P., Corbetta, C., Melotti, D.** 2000. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *Journal of Clinical Virology*. **17**: 159-165.
- 110- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Luraschi, C., Corbetta, C.** 1996. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. *Clinical and Diagnostic Virology*. **6**: 27-32.
- 111- Johansson, P. J. H., Jonsson, M., Ahlfors, K., Ivarsson, S. A., Svanberg, L., Guthenberg, C.** 1997. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **29**: 465-468.
- 112- Scanga, L., Chaing, S., Powell, C., Aylsworth, A. S., Harrell, L. J., Henshaw, N. G., Civalier, C. J., Thorne, L. B., Weck, K., Booker, J., Gulley, M. L.** 2006. Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *Journal of Molecular Diagnostics*. **8**: 240-245.
- 113- Yamagishi, Y., Miyagawa, H., Wada, K., Matsumoto, S., Arahori, H., Tamura, A., Taniguchi, H., Kanekiyo, T., Sashihara, J., Yoda, T., Kitagawa, M., Ozono, K.** 2006. CMV DNA detection in dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection in Japan. *Journal of Medical Virology*. **78**: 923-925.
- 114- Randhawa, P. S., Manez, R., Frye, B., Ehrlich, G. D.** 1994. Circulating immediate-early mRNA in patients with cytomegalovirus infections after solid organ transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*. **170**: 1264-1267.

- 115- Blok, M. J., Christiaans, M. H., Goossens, V. J., van Hooff, J. P., Top, B., Middeldorp, J. M., Bruggeman, C. A.** 1998. Evaluation of a new method for early detection of active cytomegalovirus infections. A study in kidney transplant recipients. *Transplant International*. **11**(Suppl 1): S107-S109.
- 116- Keightley, M. C., Rinaldo, C., Bullotta, A., Dauber, J., St George, K.** 2006. Clinical utility of CMV early and late transcript detection with NASBA in bronchoalveolar lavages. *Journal of Clinical Virology*. **37**: 258-264.
- 117- Paya, C. V., Holley, K. E., Wiesner, R. H., Balasubramaniam, K., Smith, T. F., Espy, M. J., Ludwig, J., Batts, K. P., Hermans, P. E., Krom, R. A.** 1990. Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. *Hepatology*. **12**: 119-126.
- 118- Puchhammer-Stöckl, E., Görzer, I.** 2011. Human Cytomegalovirus. *Future Virology*. **6**: 259-271.
- 119- Rasmussen, L., Geissler, A., Cowan, C., Chase, A., Winters, M.** 2002. The genes encoding the GCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *Journal of Virology*. **76**: 10841-10848.
- 120- Rasmussen, L., Geissler, A., Winters, M.** 2003. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *The Journal of Infectious Diseases*. **187**: 809-819.
- 121- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., Hahn, G., Nelson, J. A., Myers, R. M., Shenk, T. E.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**: 14976-14981.
- 122- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*. **85**: 1301-1312.

- 123- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerie, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., Adler, B.** 2008. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *Journal of General Virology*. **89**: 359-368.
- 124- Rigoutsos, I., Novotny, J., Huynh, T., Chin-Bow, S. T., Parida, L., Platt, D., Coleman, D., Shenk, T.** 2003. *In silico* pattern-based analysis of the human cytomegalovirus genome. *Journal of Virology*. **77**: 4326-4344.
- 125- Yan, H., Koyano, S., Inami, Y., Yamamoto, Y., Suzutani, T., Mizuguchi, M., Ushijima, H., Kurane, I., Inoue, N.** 2008. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and postnatally infected Japanese infants. *Journal of General Virology*. **89**: 2275-2279.
- 126- Zipeto, D., Hong, C., Gerna, G., Zavattoni, M., Katzenstein, D., Merigan, T. C., Rasmussen, L.** 1998. Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1–4 in immunocompromised patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. **14**: 533-536.
- 127- Mao, Z. Q., He, R., Sun, M., Qi, Y., Huang, Y. J., Ruan, Q.** 2007. The relationship between polymorphisms of HCMV *UL144* ORF and clinical manifestations in 73 strains with congenital and/or perinatal HCMV infection. *Archives of Virology*. **152**: 115-124.
- 128- Stanton, R., Westmoreland, D., Fox, J. D., Davison, A. J., Wilkinson, G. W.** 2005. Stability of human cytomegalovirus genotypes in persistently infected renal transplant recipients. *Journal of Medical Virology*. **75**: 42-46.
- 129- Lurain, N. S., Fox, A. M., Lichy, H. M., Bhorade, S. M., Ware, C. F., Huang, D. D., Kwan, S. P., Garrity, E. R., Chou, S.** 2006. Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virology Journal*. **3**: 1-18.

- 130- Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G., Chou, S., Gojobori, T., Hanada, K., Guo, J. J. K., Rawlinson, W., Britt, W., Mach, M., Landini, M. P.** 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein n (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. *Journal of General Virology*. **84**: 647-655.
- 131- Bates, M., Monze, M., Bima, H., Kapambwe, M., Kasolo, F. C., Gompels, U. A.** 2008. High human cytomegalovirus loads and diverse linked variable genotypes in both HIV-1 infected and exposed, but uninfected, children in Africa. *Virology* **382**: 28-36.
- 132- Bradley, A. J., Kovacs, I. J., Gatherer, D., Dargan, D. J., Alkharsah, K. R., Chan, P. K., Carman, W. F., Dedicoat, M., Emery, V. C., Geddes, C. C., Gerna, G., Ben-Ismaeil, B., Kaye, S., McGregor, A., Moss, P. A., Puzstai, R., Rawlinson, W. D., Scott, G. M., Wilkinson, G. W., Schulz, T. F., Davison, A. J.** 2008. Genotypic analysis of two hypervariable human cytomegalovirus genes. *Journal of Medical Virology*. **80**: 1615-1623.
- 133- Arav-Boger, R., Willoughby, R. E., Pass, R. F., Zong, J. C., Jang, W. J., Alcendor, D., Hayward, G. S.** 2002. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor- α and β -chemokine receptors in congenital CMV disease. *The Journal of Infectious Diseases*. **186**: 1057-1064.
- 134- Picone, O., Costa, J. M., Chaix, M. L., Ville, Y., Rouzioux, C., Leruez-Ville, M.** 2005. Human cytomegalovirus *UL144* gene polymorphisms in congenital infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 25-29.
- 135- Jin, H., Wang, X., Li, S.** 2007. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotype correlates with different symptoms of infected infants. *Intervirology*. **50**: 219-223.

- 136- Heo, J., Petheram, S., Demmler, G., Murph, J. R., Adler, S. P., Bale, J., Sparer, T. E.** 2008. Polymorphisms within human cytomegalovirus chemokine (*UL146/UL147*) and cytokine receptor genes (*UL144*) are not predictive of sequelae in congenitally infected children. *Virology*. **378**: 86-96.
- 137- Pignatelli, S., Lazzarotto, T., Gatto, M. R., Dal Monte, P., Landini, M. P., Faldella, G., Lanari, M.** 2010. Cytomegalovirus *gN* genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clinical Infectious Diseases*. **51**: 33-41.
- 138- Trincado, D. E., Munro, S. C., Camaris, C., Rawlinson, W. D.** 2005. Highly sensitive detection and localization of maternally acquired human cytomegalovirus in placental tissue by *in situ* polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*. **192**: 650-657.
- 139- Waters, A., Hassan, J., Gascun, C., Kisson, G., Knowles, S., Molloy, E., Connell, J., Hall, W. W.** 2010. Human cytomegalovirus UL144 is associated with viremia and infant development in congenital infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 3956-3962.
- 140- Chou, S.** 1992. Comparative analysis of sequence variation in gp116 and gp55 components of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology*. **188**: 388-90.
- 141- Haberland, M., Meyer-Konig, U., Hufert, T. F.** 1999. Variation within the glycoprotein B gene of human cytomegalovirus is due to homologous recombination. *Journal of General Virology*. **80**: 1495-1500.
- 142- Chou, S. W., Dennison, K. M.** 1991. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *The Journal of Infectious Diseases*. **163**: 1229-34.

- 143- Shepp, D. H., Match, M. E., Lipson, S. M., Pergolizzi, R. G.** 1998. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Research in Virology*. **149**: 109-114.
- 144- Yu, Z. S., Zou, C. C., Zheng, J. Y., Zhao, Z. Y.** 2006. Cytomegalovirus *gB* genotype and clinical features in chinese infants with congenital infections. *Intervirolgy* **49**: 281-285.
- 145- Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., de Deus Wagatsuma, V. M., Marin, L. J., Duarte, G., Figueiredo, L. T.** 2007. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. *Journal of Medical Virology*. **79**: 1164-1168.
- 146- Mewara, A., Mishra, B., Ratho, R. K., Kumar, P.** 2009. Cytomegalovirus glycoprotein B gene polymorphism and its association with clinical presentations in infants. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **40**: 759-764.
- 147- Tarrago, D., Quereda, C., Tenorio, A.** 2003. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: 2872-2877.
- 148- Puchhammer-Stöckl, E., Görzer, I.** 2006. Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus subtypes – the search for clinical significance. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 239-248.
- 149- Chandler, S. H., Handsfield, H. H., McDougall, J. K.** 1987. Isolation of multiple strains of cytomegalovirus from women attending a clinic for sexually transmitted disease. *The Journal of Infectious Diseases*. **155**: 655-660.
- 150- Meyer-König, U., Haberland, M., von Laer, D., Haller, O., Hufert, F. T.** 1998. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *The Journal of Infectious Diseases*. **177**: 1162-1169.

- 151- Kurkela, S., Brown, D.** 2009. Molecular diagnostic techniques. *Medicine*. **37**: 535-540.
- 152- Grosjean, J., Hantz, S., Cotin, S., Baclet, M. C., Mengelle, C., Trapes, L., Virey, B., Undreiner, F., Brosset, P., Pasquier, C., Denis, F., Alain, S.** 2009. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *Journal of Clinical Virology*. **46**(Suppl. 4): S43–S48.
- 153- Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A.** 2002. Real-Time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. **30**: 1292-1305.
- 154- Görzer, I., Kerschner, H., Jaksch, P., Bauer, C., Seebacher, G., Klepetko, W. Puchhammer-Stöckl, E.** 2008. Virus load dynamics of individual CMV-genotypes in lung transplant recipients with mixed-genotype infections. *Journal of Medical Virology*. **80**: 1405-1414.
- 155- Manuel, O., Asberg, A., Pang, X., Rollag, H., Emery, V. C., Preiksaitis, J. K., Kumar, D., Pescovitz, M. D., Bignamini, A. A., Hartmann, A., Jardine, A. G., Humar A.** 2009. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clinical Infectious Diseases*. **49**: 1160-1166.
- 156- Swerdlow, H., Wu, S. L., Harke, H., Dovichi, N. J.** 1990. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. *Journal of Chromatography A*. **516**: 61-67.
- 157- Hunkapiller, T., Kaiser, R. J., Koop, B. F., Hood, L.** 1991. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*. **254**: 59–67.
- 158- Shendure, J., Hanlee, J.** 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. **26**: 1135-1145.

- 159- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M.** 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2012**: 1-11.
- 160- Gresham, D., Dunham, M. J., Botstein, D.** 2008. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nature Reviews Genetics*. **9**: 291-302.
- 161- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B.** 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* **100**: 8817-8822.
- 162- Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermoud, J. J., Mayer, P., Kawashima, E.** 2000. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Research* **28**: e87.
- 163- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G.** 2006. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*. **34**: e22.
- 164- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., Tairi, A. P.** 2008. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research*. **36**: e25.
- 165- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swedlow, H. P., Gu, Y.** 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. **13**: 341.
- 166- Sijmons, S., van Ranst, M., Maes, P.** 2014. Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing. *Viruses*. **6**: 1049-1072.

- 167- Pang, X., Humar, A., Preiksaitis, K.** 2008. Concurrent Genotyping and Quantitation of Cytomegalovirus gB Genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR Assay. *Journal of clinical Microbiology*. **46**: 4004-4010.
- 168-** Life Technologies. Real-Time PCR handbook. Disponível em <www.lifetechnologies.com>. Consultado a 30/09/15.
- 169- Nijman, J., Mandemaker, F., Verboon-Maciolek, M., Aitken, S., van Loon, A., de Vries, L., Schuurman, R.** 2014. Genotype Distribution, Viral Load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One*. **9**: 1-7.
- 170- Bale, J. F., Murph, J. R., Demmler, G. J., Dawson, J., Miller, J. E., Petheram, S. J.** 2000. Intrauterine Cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. *Journal of Infectious Diseases*. **182**: 933-936.
- 171- Lukácsi, A., Taródi, B., Endreffy, E., Bábinszki, A., Pál, A., Pusztai, R.** 2001. Human Cytomegalovirus gB genotypes 1 is dominant in congenital infections in South Hungary. *Journal of Medical Virology*. **65**: 537-542.
- 172- Barbi, M., Binda, S., Caroppo, S., Primache, V., Didò, P., Guidotti, P., Corbetta, C., Melotti, D.** 2001. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *Journal of Clinical Virology*. **21**: 75-79.
- 173- Arista, S., de Grazia, S., Giammanco, G. M., Di Carlo, P., Iannitto, E.** 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompetent, immunocompromised, and congenitally infected Italian populations. *Archives of Virology*. **148**: 547-554.
- 174- Gandhoke, I., Hussain, S., Pasha, S. T., Chauhan, L. S., Khare, S.** 2012. *Indian Pediatrics*. **50**: 663-667.

- 175- Arellano-Galindo, J., Viillanueva-Garcia, D., Cruz-Ramirez, J., Yalaupari-Mejía, J., Uribe-Gutierrez, G., Velazquez-Guadamarra, N., Nava-Frias, M., Muñoz-Hernández, O., Mejía-Aranguré, J.** 2014. Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *The Journal of Infection in Developing Countries.* **8**: 758-767.
- 176- Paradowska, E., Studzińska, M., Suski, P., Kasztelewicz, B., Wiśniewska-Ligier, M., Zawilińska, B., Gaj, Z., Nowakowska, D.** 2015. Human cytomegalovirus UL55, UL144, and US28 genotype distribution in infants infected congenitally or postnatally. *Journal of Medical Virology.* **87**: 1737-1748.
- 177- Ross, S. A., Novak, Z., Pati, S., Patro, R. K., Blumenthal, J., Danthuluri, V. R., Ahmed, A., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Bernstein, D. I., Tolan, R. W., Palmer, A. L., Britt, W. J., Fowler, K. B., Boppana, S. B.** 2011. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Infectious Diseases.* **204**: 1003-1007.
- 178- Picone, O., Costa, J. M., Leruez-Ville, M., Ernault, P., Olivi, M., Ville, Y.** 2004. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenatal Diagnosis.* **24**: 1001-1006.
- 179- Pati, S., Pinninti, S., Novak, Z., Chowdhury, N., Patro, R., Fowler, K., Ross, S. A., Boppana, S.** 2013. Genotypic Diversity and Mixed Infection in Newborn Disease and Hearing Loss in Congenital Cytomegalovirus Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* **32**: 1050-1054.
- 180- Torok-Storb, B., Boeckh, M., Hoy, C., Leisenring, W., Myerson, D., Gooley, T.** 1997. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood.* **90**: 2097-2102.

- 181- Nye, MB., Leman, A. R., Meyer, M. E., Menegus, M. A., Rothberg, P. G.** 2005. Sequence Diversity in the Glycoprotein B Gene Complicates Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 4968-4971.
- 182- Renzette, N., Bhattacharjee, B., Jensen, J. D., Gibson, L., Kowalik, T. F.** 2011. Extensive Genome-Wide variability of Human Cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathogens*. **7**: e1001344.
- 183- Rycel, M., Wujcicka, W., Zawilińska, B., Paradowska, E., Suski, P., Gaj, Z., Wilczyński, J., Leśnikowski, Z., Nowakowska, D.** 2015. Mixed infections with distinct cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Polish pregnant women, fetuses, and newborns. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **34**: 585-591.
- 184- Ishibashi, K., Tokumoto, T., Shirakawa, H., Hashimoto, K., Kushida, N., Yanagida, T., Shishido, K., Aikawa, K., Yamaguchi, O., Toma, H., Tanabe, K., Suzutani, T.** 2008. Strain-specific seroepidemiology and reinfection of cytomegalovirus. *Microbes and Infection*. **10**: 1363-1369.
- 185- McDonagh, S., Maidji, E., Ma, W., Chang, H., Fisher, S., Pereira, L.** 2004. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *The Journal of Infectious Diseases*. **190**: 826-834.
- 186- Görzer, I., Trajanoski, S., Popow-Kraupp, T., Puchhammer-Stöckl, E.** 2015. Analysis of human cytomegalovirus strain populations in urine samples of newborns by ultra deep sequencing. *Journal of Clinical Virology*. **73**: 101-104.
- 187- Nijman, J., van Loon, A. M., de Vries, L. S., Koopman-Esseboom, C., Groenendaal, F., Uiterwaal, C. S., Verboon-Macielek, M. A.** 2012. Urine viral load and correlation with disease severity in infants with congenital or postnatal cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*. **54**: 121-124.

188- Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S., Enders, M. 2011. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *Journal of Clinical Virology*. **52**: 244-246.

6. Anexos

Anexo 1: Poster apresentado no 14º Encontro Nacional de Atualização em Infeciologia Porto, Portugal.



Anexo 2: Resultados da sequenciação pela técnica de *IonTorrent* (n=7).

Amostra U123

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	19798	20802	18726	25215	26003	26009	11459	10918	17282
Max Coverage	8772x	9659x	8188x	13140x	13637x	13639x	6102x	5974x	7908x
de novo & blast score	858	868	844	1,030	1,044	1,044	668	652	804

Amostra U125

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	6923	6694	6413	9841	10324	10330	17056	16582	6355
Max Coverage	5715	5561	5521	5508	5562	5561	7887	7545	5481
de novo & blast score	662	652	648	714	734	734	1100	1064	632

Amostra U158

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	11813	12543	10696	17294	17480	17479	7830	7138	10906
Max Coverage	5577	5651	5455	8841	8887	8885	4170	4084	5063
de novo & blast score	672	676	666	848	862	862	500	486	616

Amostra LA186

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	13530	13990	13491	11706	12794	12787	6172	6393	8770
Max Coverage	6996	7062	6894	7035	7042	7039	5049	4954	6785
de novo & blast score	1026	1036	1012	870	884	884	618	622	866

Amostra U327

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	5474	5884	4978	8382	8494	8489	4488	4068	4645
Max Coverage	3253	3304	3164	3301	3307	3307	2395	2363	2958
de novo & blast score	900	910	884	1096	1096	1096	714	698	830

Amostra U375

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	16627	17862	14978	259,000	26186	26186	11259	10031	15877
Max Coverage	7944	8939	7015	15063	15146	15149	5238	5109	8525
de novo & blast score	938	942	898	1034	1044	1044	752	746	842

Amostra U377

Genotype	SB1			SB2			SB3		SB4
Accession number	M60929	AY4468942	FJ616285,1	M60931	X04606	X17403,1	M85228	GU937742,1	M60926
Number of Mapped Reads	5486	5319	5036	8438	8946	8944	15374	14996	4936
Max Coverage	4590	4471	4394	4403	4474	4471	7829	7513	4353
de novo & blast score	572	562	556	606	622	622	992	958	556